Aus der Abteilung Innere Medizin mit Schwerpunkt
Hämatologie und Onkologie des Klinikums Charlottenburg
der Freien Universität Berlin
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. H. Gerhartz

Der Einfluß zyklischer Nukleotide auf die Proliferation menschlicher erythroider Stammzellen (BFU-E) in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Stefan Serke
aus Berlin

1985

Aus der Abteilung Innere Medizin mit Schwerpunkt
Hämatologie und Onkologie des Klinikums Charlottenburg
der Freien Universität Berlin

Abteilungsleiter: Prof.Dr.med. H. Gerhartz

Der Einfluß zyklischer Nukleotide auf die Proliferation menschlicher erythroider Stammzellen (BFU-E) in vitro

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Stefan Serke
aus Berlin

Referent: PD.Dr.med. B.M.Bombik

Korreferent: Prof.Dr.med. G.Schulz

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 23.5.1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einführung	5
1.1. Einleitung und Darstellung der Zielsetzung	5
1.2. Arbeitsmodell zur Hämopoese	6
1.3. Einfluß von zyklischen Nukleotiden auf den Zellstoffwechsel, die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung	13
1.3.1. Wirkungsmechanismen zyklischer Nukleotide	13
1.3.2. Hämopoese und zyklische Nukleotide	17
2. Material und Methoden	19
3. Ergebnisse	25
3.1. Morphologie der in vitro-Kulturen	25
3.2. Einfluß von DB-cAMP, 8-Br-cGMP, Adenosin und Butyrat auf die Proliferation der BFU-E des Blutes	31
3.2.1. Wirkung von DB-cAMP, 8-Br-cGMP, Adenosin und Butyrat nach Zufügung zum in vitro-System zum Zeitpunkt t_o der Inkubation	32
3.2.2. Wirkung von DB-cAMP-, 8-Br-cGMP-, Adenosin- und Butyrat-konditionierten Medien	38
3.2.3. Wirkung einer 1-stündigen Präinkubation der PBMC in Testsubstanz-Flüssigkeitskulturen	40
4. Diskussion	42
5. Zusammenfassung der Arbeit	48
6. Literaturverzeichnis	49
Danksagungen	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid
BPA	Burst Promoting Activity
8-Br-cGMP	8-Bromo-zyklisches Guanosinmonophosphat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CFU-E	Colony Forming Unit-Erythroid
CFU-Meg	Colony Forming Unit-Megacaryocyte
CFU-M/G	Colony Forming Unit-Macrophage/Granulocyte
CFU-S	Colony Forming Unit-Spleen
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CSF	Colony Stimulating Factor
DB-cAMP	Dibutyryl-zyklisches Adenosinmonophosphat
EEF	Erythroblast Enhancing Factor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PHA-M	Phytohämagglutinin-M

1. Einführung

1.1. Einleitung und Darstellung der Zielsetzung

Wesentliche Aufschlüsse über die Regulation der Differenzierung und der Proliferation hämopoetischer Stammzellen konnten in jüngerer Zeit durch die Einführung sogenannter Gewebekulturen auch auf dem Gebiet der experimentellen Hämatologie erbracht werden (3,36,37,45). Diese in vitro-Techniken zeichnen sich gegenüber dem in vivo-Modell durch 3 Vorteile aus:

a) Beobachtung des Verhaltens gezielt fraktionierter Zellpopulationen,
b) Möglichkeit der selektiven Manipulierbarkeit der zu beobachtenden Zellpopulation,
c) Kontrollierte, d.h. konstante Kulturbedingungen.

Das Ziel dieser Arbeit ist, den Einfluß zweier zyklischer Nukleotide, des DB-cAMP und des 8-Br-cGMP auf die primitiven erythroiden Stammzellen des peripheren Blutes des Menschen zu untersuchen. Diese primitiven erythroiden Stammzellen werden als BFU-E bezeichnet.

Wir bringen daher zwei kurze Übersichten zu den derzeit akzeptierten Vorstellungen über die Hämopoese mit besonderer Berücksichtigung der in vitro-Systeme und über den Einfluß zyklischer Nukleotide auf die Zellfunktionen.

1.2. Arbeitsmodell zur Hämopoese

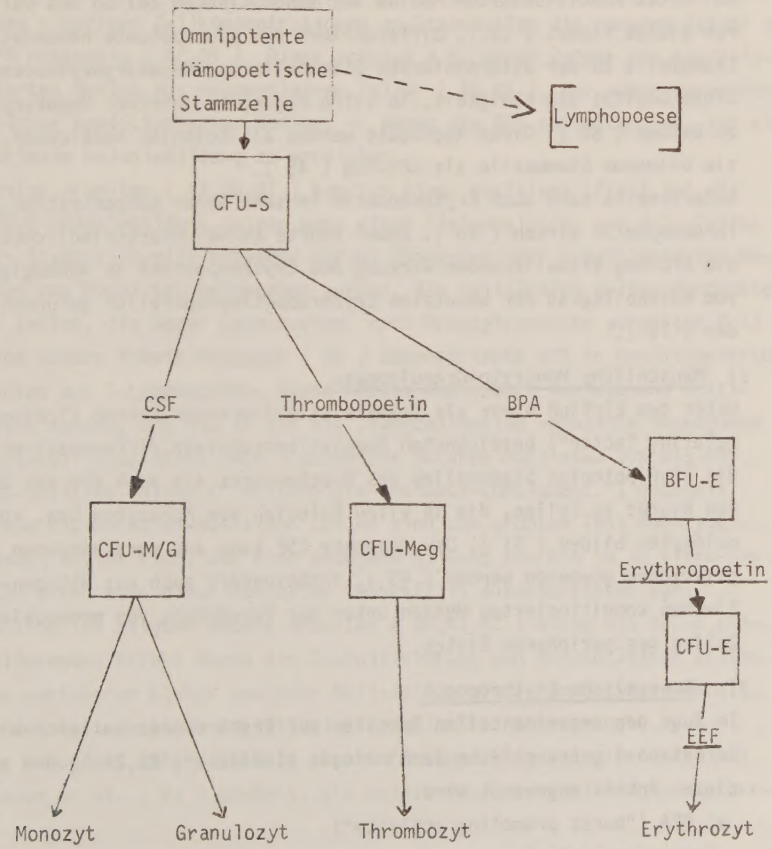
Das hämopoetische System ist als typisches Wechselgewebe wie beispielsweise auch die Darmmukosa oder die Epidermis auf eine sogenannte Stammzellreserve ("stem-cell pool") (66) angewiesen, die zwei Eigenschaften zu besitzen hat (36):

a) Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und
b) Die Fähigkeit zur Differenzierung in determinierte Stammzellen, die in die organspezifischen Funktionszellen ausreifen.

Eine solche Stammzelle der Hämopoese konnte experimentell erstmals 1961 in Form der CFU-S ("colony forming unit-spleen") nachgewiesen werden (67). Es konnte jedoch nur die funktionelle Existenz einer solchen Stammzelle dargestellt werden, ihre morphologische Natur blieb bis zum heutigen Tag ungeklärt. Es erscheint am wahrscheinlichsten, daß sie in einer als Null-Zell-Fraktion bezeichneten Population von Lymphozyten zu finden ist (13). Der 1961 am Tiermodell erbrachte Nachweis der omnipotenten hämopoetischen Stammzelle CFU-S (67) konnte 1979 auch im in vitro-System (33) experimentell bestätigt werden.
Aus dieser omnipotenten Stammzelle entwickelt sich dann unter dem Einfluß humoraler Regulationssubstanzen die determinierte Stammzelle einer jeden hämopoetischen Zellreihe (19,45).
Die Abbildung 1 skizziert dieses Arbeitsmodell für alle hämopoetischen Zellreihen.

Abbildung 1:

Arbeitsmodell der Hämopoese
(Regulationssubstanzen sind unterstrichen,
Zellreihen sind in Kästchen gesetzt)



Wie aus der Abbildung 1 zu entnehmen ist, sind grundsätzlich drei verschiedene Zellreihen der Hämopoese zu unterscheiden: die Megakaryopoese, die Erythropoese und die Monozyto-Granulopoese.
Diese Zellsysteme werden nun dargestellt, wobei der Schwerpunkt auf die Darstellung der Erythropoese gelegt wird.

1) Menschliche Megakaryozytopoese

Unter dem Einfluß eines postulierten, jedoch bislang nicht identifizierten "Thrombopoetins", welches sich einerseits in Phytohämagglutinin-stimuliertem konditioniertem Medium aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes findet (72), differenziert die pluripotente hämopoetische Stammzelle zu der determinierten Stammzelle der Megakaryozytopoese. Diese besitzt die Fähigkeit, in vitro Aggregate mehrerer Megakaryozyten zu bilden (62). Diese Aggregate werden als Kolonien bezeichnet, die sie bildende Stammzelle als CFU-Meg (45).
Andererseits kann auch Erythropoetin in sehr hoher Konzentration als Thrombopoetin wirken (70). Dabei konnte keine Unterschiedlichkeit der die CFU-Meg stimulierenden Wirkung des Erythropoetins in Abhängigkeit vom Reinheitsgrad der benutzten Erythropoetinpräparation gefunden werden (70).

2) Menschliche Monozyto-Granulopoese

Unter dem Einfluß einer als Kolonie stimulierender Faktor ("colony stimulating factor") bezeichneten Regulationssubstanz differenzieren sowohl die pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks als auch die des peripheren Blutes zu Zellen, die in vitro Kolonien von Monozyten bzw. von Granulozyten bilden (51). Der genannte CSF kann aus verschiedenen Zellpopulationen gewonnen werden (45), insbesondere auch aus Mitogen-stimulierten konditionierten Medien unter der Verwendung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes.

3) Menschliche Erythropoese

Im Zuge der experimentellen Arbeiten zur Erythropoese hat sich eine international gebräuchliche Terminologie etabliert (23,24), die auch in dieser Arbeit angewandt wird:

a) BPA ("burst promoting activity")

Unter dem Einfluß dieser humoralen Regulationssubstanz differenziert

die pluripotente Stammzelle zu der determinierten erythroiden Stammzelle, der BFU-E ("burst forming unit-erythroid"). Die chemischen Eigenschaften dieser BPA sind schon recht genau bekannt. Es handelt sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 25 000 Dalton bis ca. 40 000 Dalton (14).
Kontroversen bestehen bezüglich der Frage, welche Zellpopulation diesen humoralen Wirkstoff produziert (14,54,74,81).
Während bei der in vitro Inkubation hoher Zellkonzentrationen keine exogene Zufuhr an BPA notwendig ist (12,15,27,70), wird bei Verwendung niedriger Zellkonzentrationen an Stammzellen die exogene Zufuhr an BPA notwendig (42,69). Diese erfolgt z.B. durch Zufuhr von konditionierten Medien aus mononukleären Zellen (46,82). Nur unter Verwendung solcher konditionierter Medien, in denen die BPA enthalten ist, ist eine optimale Koloniebildung zu erreichen.
Einige Arbeiten (79,80,81) konnten einen positiven Effekt auf die BFU-E Koloniebildung zeigen,wenn einer Zielpopulation von Null-Zellen als Stammzellquelle entweder direkt Monozyten oder konditioniertes Medium von Monozyten beigegeben wurden. Als Null-Zellen gelten mononukleäre Zellen, die weder Lymphozyten- noch Monozytenmarker aufweisen (13). Eine andere Arbeit hingegen (50) demonstrierte BPA in konditionierten Medien aus T-Lymphozyten. Diese Arbeit muß jedoch dahingehend kritisiert werden, daß die in ihr als Stammzellquelle verwandte sogenannte Null-Zell Population nach Angaben der Autoren noch etwa 30% bis 60% EAC-positive Zellen (" erythrocyte-antibody-complement ") enthielt. Diese EAC-Rosetten-positiven Zellen sind zum größten Teil Monozyten. Daraus ergibt sich, daß eine endogene Bildung von BPA im in vitro-System durch eben diese Monozyten keinesfalls ausgeschlossen war.
Schließlich zeigten andere Arbeiten (30,41,42) einen die BFU-E stimulierenden Effekt durch die Co-Kultivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes und/oder Null-Zellen mit T-Lymphozyten. Dabei wurden entsprechende konditionierte Medien nicht untersucht.
Als besonders interessant in unserem Zusammenhang sei die Arbeit von Lipton et al. (41) erwähnt. Sie zeigte ein unterschiedliches Anspre-

chen der BFU-E aus dem Knochenmark einerseits und aus dem peripheren Blut andererseits auf konditioniertes Medium aus T-Lymphozyten. Eine derartige funktionale Verschiedenheit der beiden unterschiedlichen BFU-E Populationen, aus dem Knochenmark und aus dem peripheren Blut, war schon anderswo beschrieben worden (1).

b) BFU-E (" burst forming unit-erythroid ")

Unter dem Einfluß der genannten BPA differenziert die pluripotente Stammzelle zur primitiven erythroid determinierten Stammzelle. Diese wird nach ihrem in vitro-Verhalten als "Haufen bildende Einheit" bezeichnet. Diese BFU-E bildet nämlich Aggregate von haufenartig lose angeordneten Kolonien aus erythroiden Zellen. Im Gegensatz zur reifen erythroiden Stammzelle, der CFU-E (Erläuterung weiter unten), ist die BFU-E sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut quantitativ relevant vorhanden (55,78).

Im Vollblut einer erwachsenen hämatologischen Normalperson finden sich aber ca. 30- bis zu 150-fach mehr BFU-E als CFU-E.

Die Bildung der Aggregate von mehreren erythroiden Zellen, welche als Kolonien bezeichnet werden, beginnt nach ca. 6 bis 7 Tagen der Inkubation im in vitro-System. Die zu beobachtenden erythroiden Kolonien werden als Haufen bezeichnet, da sie zum größten Teil aus Ansammlungen von 2 und mehr Subkolonien bestehen. Die Abbildung 3 zeigt eine solche aus Subkolonien aufgebaute Haufenkolonie. Der Grad der Hämoglobinisation der einzelnen Zellen innerhalb der Kolonien differiert stark, teilweise lassen sich auch nicht-erythroide Zellen in diesen Kolonien nachweisen (12,65).

Das Maximum an BFU-E Kolonien, die dann nahezu ausschließlich aus vollständig hämoglobinisierten Zellen gebildet werden, wird um den Tag 11 bis 14 der Inkubation erreicht (12,15,42,61).

Wird Knochenmark als Stammzellquelle benutzt, so kann man nach 17 bis 20 Tagen der Inkubation noch die Ausbildung von besonders großen BFU-E Kolonien beobachten (27,65). Diese bestehen aus mehr als 16 Subkolonien. Demgegenüber beträgt die durchschnittliche Anzahl der Subkolonien pro BFU-E Kolonie nach 11 bis 14 Tagen der Inkubation nur etwa 5 bis 10. Dies gilt für die BFU-E des peripheren Blutes wie für die des Knochenmarks.

Während zur Proliferation der BFU-E kein Erythropoetin notwendig ist, sondern einzig die BPA (69), erfordert die endgültige Differenzierung der BFU-E zur CFU-E die Anwesenheit von Erythropoetin im in vitro -System. Dieses Hormon ist ebenfalls notwendig, um die Hämoglobinisierung der CFU-E und damit ihre Differenzierung zu Erythroblasten, zu ermöglichen (12).
Obwohl die morphologische Natur der BFU-E nicht geklärt ist, erscheint es gesichert, daß sie sich in der Null-Zell Population der mononukleären Zellen befindet (13,50).
Im peripheren Blut der erwachsenen hämatologischen Normalperson stellen die BFU-E etwa 0,15% der mononukleären Zellen dar (12). Mittels kombinierter physikalisch-immunologischer Techniken konnte eine Anreicherung der BFU-E von den genannten 0,15% auf 0,30% erreicht werden (76).

c) Erythropoetin

Unter dem Einfluß dieses Proteohormons differenziert die BFU-E zur reifen erythroiden Stammzelle, der CFU-E. Erythropoetin ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 39 000 Dalton. Der vorwiegende physiologische Bildungsort ist die Niere (14,16).

d) CFU-E (" colony forming unit-erythroid ")

In der Reifungssequenz: hämopoetische omnipotente Stammzelle - pluripotente hämopoetische Stammzelle(CFU-S) - BFU-E - CFU-E - Normoblast hat die CFU-E den Rang der determinierten Stammzelle, deren direktes Reifungsprodukt der morphologisch und funktionell als direkter Vorläufer des Erythrozyten zu bezeichnende Normoblast ist.
Die CFU-E ist ebenfalls Teil der Null-Zell Population, sie ist, wie oben dargestellt, in quantitativer Bedeutung jedoch nur im Knochenmark vorhanden (59). Während auf 1 x 10^5 mononukleäre Zellen des Knochenmarks etwa 0,01 x 10^5 CFU-E kommen, beträgt die Anzahl an CFU-E in der mononukleären Zellpopulation des peripheren Blutes nur etwa 0,001 x 10^5 CFU-E pro 1 x 10^5 mononukleäre Zellen. Dabei ist jedoch noch eine erhebliche interindividuelle Schwankung zu beachten. Teilweise lassen sich überhaupt keine CFU-E im peripheren Blut von Normalpersonen nach-

weisen (Eigene Beobachtungen).
Die von der CFU-E gebildeten Kolonien lassen sich nach 5 bis 9 Tagen der Inkubation einer mononukleären Zellpopulation des Knochenmarks beobachten. Es handelt sich um unizentrische Zellaggrgate aus Zellen, die vollständig hämoglobinisiert sind. Sie entsprechen morphologisch den Normoblasten (65). Eine solche CFU-E Kolonie besteht aus bis zu 1000 Einzellen (65).
Es gilt heute die Vorstellung, daß die unreife erythroide Stammzelle, die BFU-E, in die reife, die CFU-E, ausreift. Die bei der Erläuterung der BFU-E genannten Subkolonien der BFU-E Kolonien sind somit als jeweils aus einer CFU-E entstanden zu erklären. Dadurch erklärt sich die morphologische Identität zwischen CFU-E Kolonie und BFU-E Subkolonie hinreichend.

e) EEF (" erythroblast enhancing factor ")
Diesem erst kürzlich und bislang in einer einzigen Arbeit (39) beschriebenen Regulationsstoff der Erythropoese wird eine Aktivierung der Hämoglobinsynthese der Normoblasten in Synergismus mit Erythropoetin zugeschrieben.

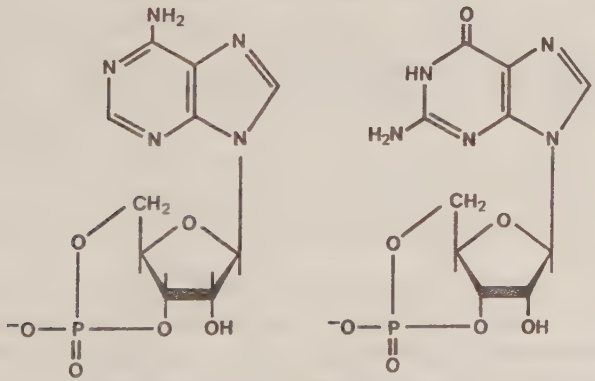
Zusammengefaßt stellt sich die Erythropoese
also wie folgt dar (siehe auch Abbildung 1):

Aus der omnipotenten hämopoetischen Stammzelle differenziert unter dem Einfluß unbekannter Regulationnssubstanzen die pluripotente hämopoetische Stammzelle (CFU-S). Aus der CFU-S entsteht unter dem Einfluß der BPA die primitive erythroide Stammzelle, die BFU-E. Aus dieser BFU-E entsteht dann unter dem Einfluß des Erythropoetins die CFU-E, der direkte Vorläufer des Erythroblasten. Aus den Erythroblasten entstehen dann schließlich die Funktionszellen des peripheren Blutes, die Erythrozyten.

1.3. Einfluß zyklischer Nukleotide auf den Zellstoffwechsel, die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung

1.3.1. Wirkungsmechanismen zyklischer Nukleotide

Die zyklischen Nukleotide sind ubiqitär in der Tierwelt vorkommende biologisch aktive Substanzen. Die mittleren intrazellulären Konzentrationen betragen 10^{-6}M bis zu 10^{-9}M (29). Die Abbildung 2 zeigt die Strukturformeln des zyklischen Adenosin-3´:5´-Phosphats und des zyklischen Guanosin-3´:5´-Phosphats. In unseren Experimenten wurden zwei Derivate dieser beiden zyklischen Nukleotide benutzt, das Dibutyryl-cAMP und das 8-Br-cGMP.



cAMP cGMP

Abbildung 2

Zahlreiche Hormone vermitteln ihre intrazellulären Wirkungen über zyklische Nukleotide als sogenannte zweite Boten ("second messenger") des Hormons (2, 17). Im Falle des cAMP ist direkt cAMP selbst der zweite Bote, im Falle des cGMP führt die Bindung des Hormons an den Zellmembran-Rezeptor primär zu einer Erhöhung des intrazytoplasmatischen Ca^{++}-Spiegels, erst sekundär kommt es dann durch die Stimulation einer Guanylat-Zyklase zu einer Erhöhung des intrazytoplasmatischen cGMP-Spiegels.

Die heutigen Vorstellungen zur Wirkungskette: extrazelluläres Hormon, Zellmembran, Enzymsystem, intrazelluläre Wirkungen seien kurz dargestellt.

a) cAMP

Membrangebunden findet sich der Rezeptor-Adenylat-Zyklase-Komplex. Dieser besteht aus mehreren Untereinheiten:

1. Hormonrezeptor (R)

An diesen Rezeptor bindet das entsprechende Hormon. Es werden zwei verschiedene Rezeptortypen unterschieden (35), zur Stimulation des Systems führend und zur Inhibition des Systems führend.

2. Katalytische Untereinheit (C)

Diese katalysiert die Reaktion ATP $\longrightarrow$ cAMP + Pyrophosphat

3. Guanosintriphosphat-bindendes Regulatorprotein (N_S und N_I)

Nach Ausbildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes findet eine weitere Bindung in Form der Ausbildung des Hormon-Rezeptor-Regulatorprotein-Komplexes statt. Durch diese Komplexbildung löst sich an das Regulatorprotein gebundenes Guanosindiphosphat. Nun bindet Guanosintriphosphat an das Regulatorprotein und es kommt zur Ausbildung des enzymatisch aktiven N_{GTP}-C-Komplexes. Es erfolgt nun die Bildung von cAMP, wenn die Aktivierung des stimulierenden Regulatorproteins (N_S) erfolgte.

Die Inaktivierung des N-Komplexes erfolgt durch eine GTP-ase des N-Komplexes.

Das im geschilderten Ablauf gebildete cAMP aktiviert zytosolische und nukleäre cAMP-abhängige Proteinkinasen (38,44). Diese aktivierten Proteinkinasen bewirken den Transfer einer Phosphatgruppe von ATP auf einen spezifischen Serin- oder Threoninrest ihres Zielproteins (z.B. Enzym). Diese Phosphorylierung verändert die Proteinkonformation und darüber z.B. die enzymatische Aktivität.

Der Abbau und damit die Inaktivierung des cAMP erfolgt durch Phosphodiesterasen.

b) cGMP

Katalysiert durch eine lösliche, zytosolische und eine membranständige Guanylat-Zyklase entsteht intrazellulär nach der Gleichung GTP ⟶ cGMP + Pyrophosphat das cGMP (75). Diese Guanylat-Zyklase ist, wie gesagt, im Gegensatz zur Adenylat-Zyklase, nicht nur membranständig vorhanden, sondern auch in löslicher Form im Zytosol.
Prinzipiell führen drei verschiedene Wege zur Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration:

1. Nach Bindung des Auriculin ("atrial natriuretic factor") an den Rezeptor kommt es direkt zu einer Stimulation der gebundenen Guanylat-Zyklase.
2. Am Endothel kommt es nach Bindung von Histamin an H_1-Rezeptoren zur Produktion von Arachidonsäure-Derivaten.Diese werden in einer Sammelbezeichnung als " endothelium derived relaxation factor " bezeichnet. Diese führen dann zu einer Aktivierung der löslichen Guanylat-Zyklase.
3. Bindet Adrenalin an einen $alpha_1$-Rezeptor, so führt dies zu einer Erhöhung des zytoplasmatischen Ca^{++}-Spiegels. Im Anschluß daran erfolgt die Bildung von Arachidonsäure-Derivaten. Diese stimulieren die lösliche Guanylat-Zyklase.

Neben den geschilderten Wirkungen auf diese Zellfunktionen sind die zyklischen Nukleotide auch eng mit den Funktionen des Zellzyklus verbunden (8, 18,39). Es ist allgemein akzeptiert, daß Erhöhungen des zytoplasmatischen cAMP-Spiegels mit einer Blockierung der Proliferation einhergehen, eine Erhöhung des cGMP-Spiegels hingegen ist mit dem Eintritt in den Zellzyklus assoziiert (21,32). Auch hierbei erfolgt die Wirkung der zyklischen Nukleotide über cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen. Diese führen zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung oder Inaktivierung von Histonen und Nicht-Histonen im Kern. Es wird angenommen, daß durch diese Aktivierung oder Inaktivierung eine Repression oder Derepression von für die Proliferation essentiellen Genomen erfolgt (38).

während bis vor wenigen Jahren den beiden zyklischen Nukleotiden cAMP und cGMP ein Antagonistenverhältnis zugeschrieben worden war (20), gilt es heute als gesichert, daß ein solches nicht besteht (63). Allerdings konnten bezüglich der Proliferation bestimmter (Tumor)Zellinien gegensätzliche Effekte entsprechender Konzentrationen an cAMP und cGMP nachgewiesen werden (28).

In unserem Zusammenhang als besonders wesentlich ist zu erwähnen, daß die zyklischen Nukleotide verschiedenste Funktionen der Lymphozyten beeinflussen: die Migration, die Proliferation, die Differenzierung und das Sekretionsverhalten (53). Während für das cAMP belegt ist, daß es die Zytotoxizität von T-Lymphozyten inhibiert (57), bestehen Kontroversen bezüglich der Beeinflussung durch die zyklischen Nukleotide in Bezug auf die lymphozytäre Produktion und/oder Sekretion von Lymphokinen wie beispielsweise des MIF (" migration inhibitory factor ") (25,29,31). Dies ist hier insbesondere erwähnenswert, da eine Regulationssubstanz der BFU-E Proliferation, die BPA, nach den vorliegenden experimentellen Daten von T-Lymphozyten gebildet wird (77).

1.3.2. Hämopoese und zyklische Nukleotide

Die wenigen experimentellen Daten bezüglich der Wirkung zyklischer Nukleotide auf die Proliferation und die Differenzierung hämopoetischer Zellen seien in einer Übersicht zusammengestellt:

1. In Kurzzeit-Kulturen tierischer wie auch menschlicher Knochenmarkszellen (10,26) konnte gezeigt werden, daß DB-cAMP die Hämoglobinsynthese steigert bzw. den Einbau von radioaktiv markiertem Eisen in die Normoblasten fördert. Dieser stimulierende Effekt des DB-cAMP kam in einer Untersuchung quantitativ dem des Erythropoetin gleich (9). Diese Wirkung des DB-cAMP konnte von anderen Autoren jedoch nicht bestätigt werden (24).
   Das 8-Br-cGMP zeigte in den genannten Arbeiten (9,10,24,26) keine meßbare Wirkung.

2. Der Einfluß der beiden zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP auf die in-vitro Proliferation hämopoetischer Stammzellen konnte in einigen Arbeiten dargestellt werden, wobei sowohl tierische als auch menschliche Stammzellen untersucht wurden.
   Für die Monozyten-Granulozyten-Stammzelle (CFU-M/G) des menschlichen Knochenmarks konnte gezeigt werden: DB-cAMP hemmt dosisabhängig in einem Bereich von 10^{-5}M bis 10^{-10}M die Proliferation. Das 8-Br-cGMP fördert die Proliferation dosisabhängig in dem für DB-cAMP angegebenen molaren Bereich. In dieser Arbeit wurden keine Kontrollen mit Adenosin durchgeführt (64).
   Für die primitive erythroide Stammzelle des menschlichen Knochenmarks (BFU-E) konnte eine die Proliferation hemmende Wirkung des DB-cAMP gezeigt werden, cGMP oder Derivate davon wurden nicht untersucht (60).
   Die reife erythroide Stammzelle (CFU-E) des Menschen wird durch DB-cAMP in ihrer Proliferation gehemmt, 8-Br-cGMP steigert dosisabhängig die Proliferation (11).
   In in-vitro Kulturen murinen Knochenmarks konnten Ergebnisse gezeigt werden, die denen für das menschliche Knochenmark analog sind:
   Die murinen BFU-E des Knochenmarks werden in ihrer Proliferation durch

DB-cAMP gehemmt, das 8-Br-cGMP, andere cGMP-Derivate oder Adenosin wurden nicht untersucht (60).

Murine CFU-M/G lassen sich dosisabhängig durch DB-cAMP in ihrer Proliferation hemmen, 8-Br-cGMP steigert dosisabhängig die Proliferation (22, 40).

Die megakaryozytäre Stammzelle (CFU-Meg) wird in ihrer Proliferation durch DB-cAMP gefördert, 8-Br-cGMP zeigt keine meßbare Wirkung (5).

In allen zum Thema " Zyklische Nukleotide und Hämopoese " genannten Arbeiten wurden die zyklischen Nukleotide in den in-vitro-Systemen in Konzentrationen von 1×10^{-3}M bis zu 1×10^{-9}M eingesetzt (10,11,22). Die in-vivo Werte betragen für cAMP etwa 1×10^{-6}M bis 1×10^{-8}M, für cGMP betragen sie etwa 1×10^{-8}M bis 1×10^{-9}M (29).

2. Material und Methoden

1. Als Stammzellquelle und als Quelle mononukleärer Zellen zur Herstellung konditionierter Medien diente peripheres Blut gesunder Normalpersonen im Alter von 20 bis 40 Jahren.
   Gewonnen wurde das Blut mittels Venenpunktion aus der V.mediana cubiti. Die Antikoagulation erfolgte mit Stabilisator-freiem Heparin (Hoffmann-La Roche, Basel). Es wurden 10 Einheiten Heparin pro 1 ml Vollblut benutzt.

2. Das Vollblut wurde unverdünnt uber eine Ficoll-Metrizoatlösung (Lymphoprep, Nyegaard,Oslo) geschichtet. Das Volumenverhältnis betrug 10 ml Vollblut zu 7,5 ml Lymphoprep.

3. Die Zentrifugation erfolgte in einer Kühlzentrifuge (K III, Heräeus, Osterode) bei +4^{o}C, für 20 min bei 800 g.

4. Nach dem Zentrifugationsvorgang konnte die mononukleäre Zellschicht als Zwischenschicht leicht abpipettiert werden (8). Diese mononukleäre Zellpopulation, als PBMC abgekürzt, setzt sich wie folgt zusammen:

Monozyten	12% bis 30%
Lymphozyten	70% bis 88%

   (79,80, eigene Untersuchungen). Diese Zellpopulation enthält sowohl BFU-E als auch CFU-M/G und CFU-Meg (3,42,47,64,71,82). Die durchschnittliche Ausbeute an PBMC pro ca. 90 ml Vollblut betrug bei einer Konzentration der PBMC von 1 x 10^{7} PBMC/1 ml etwa 4 ml PBMC-Suspension.

5. Das benutzte in vitro-System war die "plasma clot"-Technik von Mc Leod et al. (43) in einer hier modifizierten Form:
   a)Alpha Medium ohne Nukleoside (Gibco,U.K.) wurde für MEM Eagle eingesetzt. Die Supplementierung erfolgte mit L-Glutamin, 200 mM, 100-fach konzentriert; Natrium Pyruvat, 100 mM, 100-fach konzentriert; nicht essentielle Aminosäuren, 100 mM, 100-fach konzentriert; die Supplementierung erfolgte in jeweils 1%-iger Konzentration.
   b)Zur Plasmaklumpen- (" plasma clot ") Bildung diente zitriertes Rinderplasma (Gibco, U.K.).

c)Anstatt Rinderembryonenextrakt wurde Rinderthrombin der Stufe I (Sigma, München) benutzt (12)

d)Menschliches AB-Serum (Blutbank im Klinikum Charlottenburg) wurde anstatt fötalem Kälberserum benutzt.

e)Erythropoetin gewonnen aus Phenylhydrazin-behandelten Schafen (Connaught Lab., Kanada) wurde benutzt. In einer Versuchsreihe wurde jeweils nur eine Charge benutzt. Die Konzentration des Erythropoetins im in vitro-System betrug 3 Einheiten pro 1 ml.

f)L-Asparagin (Serva, Heidelberg) wurde in Alpha Medium ohne Nukleoside gelöst. Die Konzentration im in vitro-System betrug 0,02 mg pro 1 ml.

g)Rinder-Serumalbumin Fraktion V (Sigma, München) wurde in einer 10%-igen Lösung in Dulbecco´s Phosphat-gepufferter Salzlösung (Seromed, München) benutzt. Wie schon von Tepperman et al. (65) erwähnt, kommt diesem Mediumbestandteil eine entscheidende, wenn auch unspezifische Bedeutung im Hinblick auf die BFU-E Proliferation zu. Von Charge zu Charge der Fraktion V ergaben sich bei sonst konstanten Versuchsbedingungen erhebliche Unterschiede in der Ausbeute an BFU-E in unseren Vorversuchen. Es wurde daher für jede Versuchsreihe nur eine Charge benutzt.

h)Als Antibiotika wurden Penicillin (100 Einheiten/1 ml) und Streptomyzin (50 mikrogramm/1 ml) benutzt (beide von Seromed, München).

i)Die benutzten zyklischen Nukleotide und Kontrollsubstanzen waren: DB-cAMP (Sigma, München); 8-Br-cGMP (Sigma, München); Na-Butyrat (Sigma, München); Adenosin (Serva, Heidelberg). Die Auswahl der beiden Derivate des cAMP und des cGMP, nämlich des DB-cAMP und des 8-Br-cGMP erfolgte betreffs des DB-cAMP wegen seiner hohen Lipophilie im Vergleich zu cAMP; damit ist eine hohe Diffusionsfähigkeit durch Zellmembranen verbunden (63). Das 8-Br-cGMP wurde wegen der diesem Derivat eigenen hohen Stabilität gegenüber hydrolytischer Spaltung (20) ausgewählt. Beiden ausgewählten Derivaten ist gemeinsam, daß sie in allen vorliegenden, im Text erwähnten Arbeiten (5,9,10,11,22,24,26,40,60,64) als Derivate des cAMP und des cGMP zur Anwendung kamen.

6. Das in vitro-System

Die Inkubation erfolgte in 35 x 10 mm Plastikpetrischalen (Greiner, Nürnberg). Der Plasmaklumpen setzte sich pro Petrischale aus 0,5 ml der folgenden Mischung zusammen:

0,20 ml AB-Serum
0,10 ml Rinderthrombin in Alpha Medium
0,10 ml L-Asparagin in Alpha Medium
0,10 ml Albumin-Fraktion V
0,10 ml Erythropoetin in Alpha Medium
0,10 ml PBMC-Suspension in Alpha Medium; Zellkonzentration 1×10^7 PBMC/1 ml
0,10 ml Supplementiertes Alpha Medium
0,01 ml DB-cAMP,8-Br-cGMP,Adenosin oder Na-Butyrat in Alpha Medium; Konzentrationen jeweils 1×10^{-3}M, 1×10^{-4}M sowie 1×10^{-5}M.

Diese Bestandteile wurden durch mehrmaliges Pipettieren gemischt, anschließend wurden 0,10 ml des zitrierten Rinderplasmas hinzugefügt. Es erfolgte nun ein nochmaliges dreifaches Pipettieren. Danach wurden 0,50 ml aspiriert und langsam in der Petrischale zentral ausgelassen. Der Plasmaklumpen erstarrte nach 10 min bis 15 min.
Nachdem der Plasmaklumpen erstarrt war, wurden um ihn herum 0,80 ml eines weiteren Nährmediums in die Petrischale gefüllt. Dieses Medium setzte sich wie folgt zusammen: 0,80 ml Supplementiertes Alpha Medium
0,20 ml AB-Serum
Schließlich wurden die Petrischalen in den Inkubator verbracht (Cytoperm, Heräeus, Berlin). Die Inkubation erfolgte bei + 37,5°C, 100% rel. Feuchte und einem CO_2-Partialdruck von 5 % (Standardbedingungen). Alle Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt.

7. Gewinnung von konditionierten Medien

PBMC in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/1 ml wurden in 35 x 10 mm Plastipetrischalen in Iscove´s modifiziertem Dulbecco´s Medium (34) (Gibco, U.K.) für 72 h bei Standardbedingungen inkubiert.

Da kein Träger, wie beispielsweise Methylzellulose oder Agar (45) zugesetzt wurde, handelte es sich um Flüssigkeitskulturen. So werden sie auch im Text bezeichnet sein.

Dem Medium war jeweils eine der Substanzen: DB-cAMP, 8-Br-cGMP, Adenosin oder Na-Butyrat zugesetzt; die jeweiligen Konzentrationen waren: 1 x 10^{-3}M, 1 x 10^{-4}M und 1 x 10^{-5}M.

In anderen Experimenten erfolgte die Konditionierung nicht durch die eben genannten Substanzen, sondern durch Phytohämagglutinin-M (Difco, U.S.A.) in einer Volumenkonzentration von 1% (46).

Nach 72 h wurde die Suspension abpipettiert, die Zellen wurden abzentrifugiert (+4°C, 20 min, 400 g); der so gewonnene zellfreie Überstand wurde als konditioniertes Medium dem "plasma clot"-System beigefügt. Für jeweils 0,10 ml des supplementierten Alpha Mediums wurden dann 0,10 ml des jeweiligen konditionierten Mediums eingesetzt.

8. Präinkubationsexperimente

PBMC wurden in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen / 1 ml in Iscove´s modifiziertem Dulbecco´s Medium mit folgenden Konzentrationen an DB-cAMP, 8-Br-cGMP, Adenosin sowie Na-Butyrat inkubiert: 1 x 10^{-3}M, 1 x 10^{-4}M und 1 x 10^{-5}M. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen in 35 x 10 mm Plastipetrischalen.

Die Inkubationsdauer betrug 1 h.

Da auch diesem Ansatz kein Träger zugesetzt wurde, sind auch diese Experimente als Flüssigkeitskulturen anzusprechen.

Nach 1 h Inkubation wurde die Zellsuspension durch Pipettieren gemischt, danach wurden jeweils 1,5 ml der Flüssigkeitskulturen mit 8,5 ml eiskaltem Alpha Medium ohne Nukleoside vermischt. Dann wurden die Zellen bei +4°C und 400 g für 15 min zentrifugiert. Danach wurden 9,5 ml des Mediums abpipettiert und die Zellen in 9,5 ml frischem Alpha Medium resuspendiert. Danach erfolgte wie oben beschrieben ein erneuter Zentrifugations-

gang. Dieser "Waschvorgang" wurde noch zweimal wiederholt.
Schließlich wurde eine PBMC-Suspension mit einer Konzentration von 1 x 10^7 PBMC/1 ml hergestellt und es erfolgte die Inkubation im " plasma clot ".

9. Vitalitätstestung

Vor dem Aussiedeln der PBMC im " plasma clot " bzw. vor Anlage der Flüssigkeitskulturen wurde ein Vitalitätstest mit Trypanblau (10) durchgeführt. Die Vitalität der Zellsuspension lag jeweils bei 95% bis 98% .

10. Fixierung und Färbung der " clots "

Nach Entnahme der Petrischalen aus dem Inkubator wurde das den " clot " umgebende Medium abpipettiert. Daraufhin wurde ein kreisrundes, den gesamten Boden der Petrischale bedeckendes Filterpapier (Whatman No. 12, U.K.) sorgfältig auf den " clot " aufgelegt. Anschließend wurden noch mehrere Filterpapiere aufgelegt, bis das zuletzt aufgelegte Papier trocken blieb. Dann wurden alle Filterpapiere bis auf das unterste entfernt. Auf dieses wurden 5 Tropfen einer 5%-igen Glutaraldehydlösung (Serva, Heidelberg) in Phosphatpuffer, pH 7,0, aufgetropft. Nach 6 min erfolgte durch erneut aufgelegte Filterpapiere die Trocknung. Nun wurde auch das unterste Filterpapier entfernt. Es erfolgte dann die 10-minütige Spülung der Schalen mit aq. dest. . Anschließend wurden die Präparate 24 h luftgetrocknet. Die anschließende Färbung erfolgte direkt in den Petrischalen.

a) Hämoglobin-Färbung: Es wurde nach der Methode von Mc Leod et al. (43) verfahren. 2 min in 1%-iger Lsg. von Dimethoxybenzidin (Eastman--Kodak, U.S.A.) in absolutem Methanol; dann dekantieren; 1 min in 2,5%-iger H_2O_2-Lsg. in 70%-igem Äthanol; danach dekantieren; 1 min in aq. dest.; dann dekantieren; anschließend Gegenfärbung mit Harris-Hämatoxylin (Merck, Darmstadt). Inkubationsdauer 3 min; danach 5 min Spülung mit Leitungswasser.

b) Panoptische Färbung nach Pappenheim: Routineverfahren mit modifizierten Inkubationszeiten: May-Grünwald Lsg. : 3 min; Giemsa Lsg. : 7 min.

Die Einbettung der Präparate erfolgte nach 24 h in den Schalen direkt durch Auftropfen von Vitrocloud (Langenbrick, Berlin).

11. Quantifizierung der Kolonien

Unter Verwendung eines Lichtmikroskops wurde die Quantifizierung der Kolonien durchgeführt und ihre morphologische Auswertung vorgenommen.
Die Quantifizierung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung, die morphologische Betrachtung bei 600-facher und 1000-facher Vergrößerung.
Es erfolgte nur die Quantifizierung der BFU-E Kolonien.
Folgende Definition einer BFU-E Kolonie wurde angewandt:

Ein aus mindestens 2 benachbart liegenden Subkolonien aufgebautes Kolonieaggregat. Die Zellen der Subkolonien sind hämoglobinisiert, in der panoptischen Färbung zeigen sie die Charakteristika von Normoblasten.

O D E R

Kompakte, nicht aus Subkolonien aufgebaute Einzelkolonie, die sich aus mehreren hundert Einzelzellen aufbaut. Der Hämoglobinisationsgrad dieser Zellen ist unterschiedlich, es überwiegen aber die vollständig hämoglobinisierten Zellen. Diese zeigen in der panoptischen Färbung die Charakteristika von Normoblasten.

Die Photodokumentation zeigt in den Abbildungen 3 und 4 die beiden unterschiedlichen BFU-E Koloniearten.
Die Abbildung 3b zeigt in der panoptischen Färbung eine BFU-E Kolonie, wobei die Normoblastenmorphe der Zellen deutlich erkennbar ist. Diese war schon anderswo(27, 52, 61) dokumentiert worden.

12. Photodokumentation

Die Photodokumentation erfolgte mit einem Axiomat-Photomikroskop (Zeiss, Oberkochen). Benutzt wurden Farbdia-Negativfilme, DIN 23, 160 Tungsten (Kodak, U.S.A.).

3. Ergebnisse

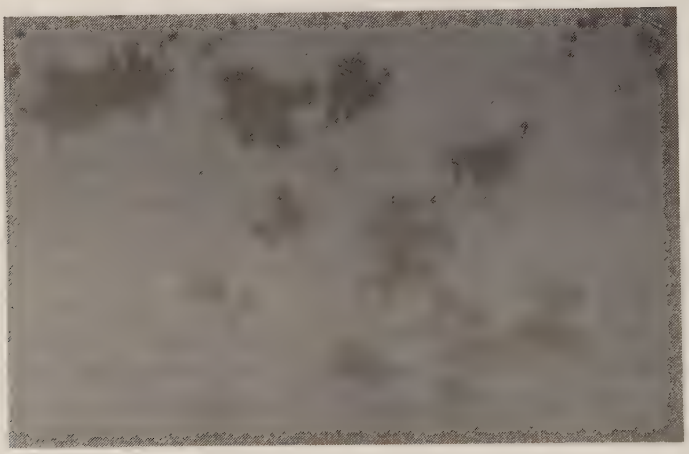
1. Morphologie der in vitro-Kulturen

a) Vereinzelt konnten CFU-Meg-, CFU-Eos- und CFU-M/G-Kolonien beobachtet werden. Eine Quantifizierung dieser Kolonien erfolgte nicht.
Es ist bekannt, daß bei der gewählten Zellkonzentration von 1 x 10^6PBMC / 1 ml Kulturvolumen die exogene Zufuhr an CSF für eine Basisstimulation von einigen CFU-M/G zur Koloniebildung nicht notwendig ist (12, 47). Gleiches gilt für die CFU-Eos , für die CFU-Meg und das Thrombopoetin (73). Bei der hohen gewählten Zellkonzentration an PBMC erfolgt eine gewisse endogene Produktion der genannten Regulationssubstanzen im in vitro-System selbst.

b) Unter Verwendung der " plasma clot "-Technik nach Mc Leod et al. (43) in einer von uns modifizierten Form konnten eindeutig der Erythropoese zuzuordnende Aggregate von Zellen in Form sogenannter Kolonien (45) nachgewiesen werden. Diese die Kolonien bildenden Zellen konnten mittels einer zytochemischen Färbung (43) als hämoglobinhaltig dargestellt werden. Auch der rein morphologische Aspekt dieser Zellen in der panoptischen Färbung nach Pappenheim ist der von erythroiden Zellen, genauer der von Normoblasten. Die Abbildung 3a zeigt eine BFU-E Kolonie in der zytochemischen Benzidinfärbung (Hämoglobinnachweis), die Abbildung 3b zeigt eine BFU-E Subkolonie in der panoptischen Färbung.

Eigene Vorversuche hatten gezeigt, daß erste Kolonien mit mehr als 8 hämoglobinisierten Zellen nach etwa 6 Tagen Inkubation zu finden sind. Diese sind, wie oben dargestellt, als CFU-E Kolonien zu bezeichnen. Der Einfluß der zyklischen Nukleotide auf diese reife erythroide Stammzelle wurde wegen der geringen Anzahl dieser Zellen im peripheren Blut und der damit verbundenen Unsicherheit einer zuverlässigen Quantifizierung der aus ihnen entstandenen Kolonien nicht untersucht.
Nur bei pathologisch veränderter Hämopoese finden sich vermehrt und dann zuverlässig quantifizierbare Mengen an CFU-E im peripheren Blut (55).
Bei normaler Hämopoese finden sich nur etwa 0,001 x 10^5 CFU-E/1 x 10^5 PBMC (55,59).

Abbildung 3: a) Multizentrische BFU-E Kolonie; Tag 11 der Inkubation; Benzidin-Färbung; Vergr. 100-fach



b) Subkolonie einer multizentrischen BFU-E Kolonie: Tag 11 der Inkubation; Panoptische Färbung; Vergr. 400-fach

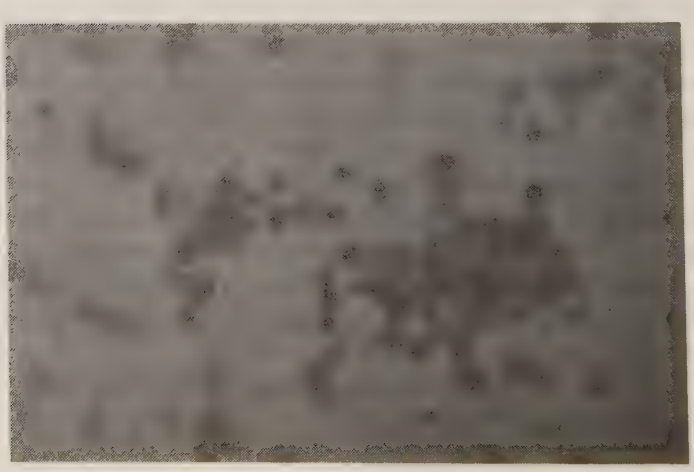
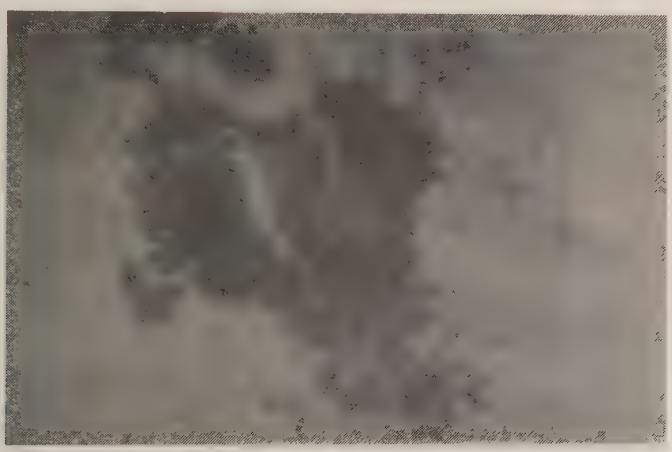


Abbildung 4: a) Unizentrische BFU-E Kolonie; Tag 11 der Inkubation; Benzidinfärbung; Vergr. 100-fach



b) Peripherie einer BFU-E Kolonie mit benachbarter Eosinophilen Kolonie; Tag 11 der Inkubation; Benzidinfärbung; Vergr. 250-fach

Abbildung 5: a) Eosinophilen Kolonie; Tag 11 der Inkubation; Benzidin-Färbung; Vergr. 400-fach

b) Eosinophilen Kolonie; Tag 11 der Inkubation; Panoptische Färbung; Vergr. 400-fach

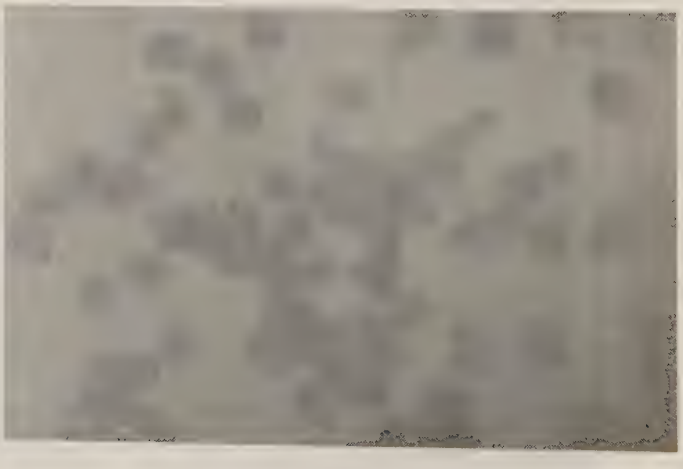
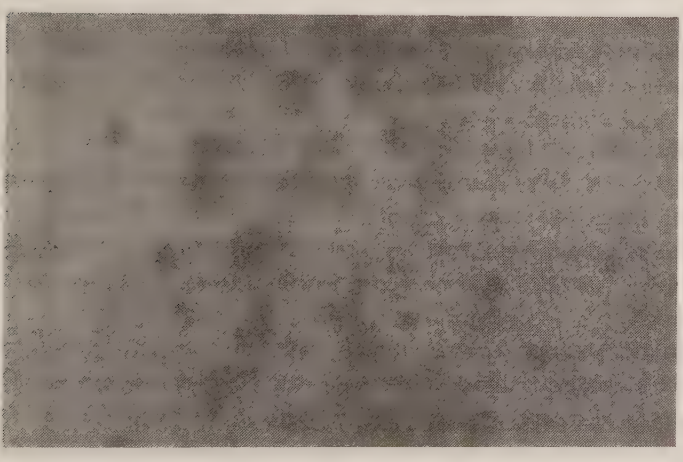


Abbildung 5: c) Peripherie einer BFU-E Kolonie und einer Eosinophilen Kolonie; Beachte die unterschiedliche Benzidinpositivität und die unterschiedliche Kernmorphe! Tag 11 der Inkubation; Vergr. 400-fach



Typische BFU-E Kolonien,aus mindestens 2 Subkolonien aufgebaut, konnten nach 6 bis 7 Tagen Inkubation beobachtet werden. Diese Subkolonien bestanden aus jeweils bis zu 40 Einzelzellen. Diese waren in der Benzidin-Färbung positiv. Vereinzelt konnten daneben auch unizentrische, nicht aus Subkolonien aufgebaute BFU-E Kolonien zu diesem frühen Zeitpunkt der Inkubation gefunden werden.
Vom Tag 8 der Inkubation bis zum Tag 11 der Inkubation nahm dann sowohl die Anzahl der BFU-E Kolonien als auch die Anzahl der Subkolonien zu. Im Gegensatz zu einem anderen Autor (12) fanden wir ein Maximum der BFU-E Kolonien am Tag 11 der Inkubation. Wieder ein anderer Autor stützt jedoch diesen von uns gefundenen Gipfel der BFU-E Kolonieanzahl am Tag 11 der Inkubation (46).
Daher wurden die Tage 8 und 11 der Inkubation zur Quantifizierung eines möglichen Effekts der zyklischen Nukleotide auf die BFU-E Proliferation ausgewählt.
Die beiden unterschiedlichen BFU-E Kolonieformen, die unizentrischen und die aus Subkolonien aufgebauten multizentrischen, zeigen die Abbildungen 3 und 4.
Diese morphologische Dualität der beiden BFU-E Kolonieformen konnte, obwohl häufig beschrieben (52,61), bislang nicht einer etwaigen Dualität der sie bildenden Stammzelle(n) zugeordnet werden.
Keine Probleme der Identifikation boten einzelne, spontan entstandene " Multizentrische Benzidin-positive Eosinophilenkolonien, die erythroide Kolonien nachahmen " (Zitat aus 49). Die Abbildungen 5a und 5b zeigen solche Eosinophilenkolonien in der Benzidinfärbung und in der panoptischen Färbung. Zum besseren Vergleich mit den Zellen der BFU-E Kolonien wurde eine direkt am Rande einer BFU-E Kolonie gelegene Eosinophilenkolonie zur Photodokumentation ausgewählt. Wie ersichtlich ist, wird die Verwechslungsmöglichkeit dieser Eosinophilenkolonien mit den BFU-E Kolonien durch drei Gründe weitgehend ausgeräumt:
1)Die Benzidin-Positivität in den Eosinophilen ist granulär, in den erythroiden Zellen ist sie homogen-diffus.
2)Die Benzidinanfärbung in den Eosinophilen ist schwach braun-gelb, in

den erythroiden Zellen ist die Benzidinanfärbung hell-orange.

3)Die unterschiedliche Kernmorphologie und die unterschiedliche Zellgröße der beiden zu unterscheidenden Zelltypen lassen eine Verwechslung ebenfalls kaum zu.

2. Einfluß von DB-cAMP, 8-Br-cGMP, Adenosin und Butyrat auf die Proliferation der BFU-E des Blutes

Wie unter Material und Methoden angegeben, wurden drei unterschiedliche Arten der möglichen Beeinflussung der BFU-E durch die von uns gewählten zyklischen Nukleotide und Kontrollsubstanzen getestet.

Neben der globalen Fragestellung, in Anlehnung an die in der Literatur übliche Versuchsanordnung (11,22,40,60,64), ob die einmalige Gabe von zyklischen Nukleotiden zum in vitro-System zum Zeitpunkt t_o der Inkubation eine Wirkung auf die BFU-E Proliferation zeigt, wurden zwei weitere bislang nicht beschriebene Möglichkeiten der Beeinflussung der BFU-E Proliferation durch die Testsubstanzen von uns untersucht.

Einerseits handelte es sich um die Testung sogenannter konditionierter Medien. In unserem Falle handelte es sich um die Konditionierung durch DB-cAMP und 8-Br-cGMP sowie durch die Kontrollsubstanzen.

Diese Fragestellung erschien uns daher von Bedeutung und Interesse, da an anderer Stelle (29) auf die Beeinflußbarkeit der Lymphozyten durch zyklische Nukleotide bezüglich der Produktion und/oder Sekretion von Lymphokinen hingewiesen worden war. Bei der humoralen Regulationssubstanz der BFU-E Proliferation, der BPA, handelt es sich mit aller Wahrscheinlichkeit um ein Lymphokin (50), obwohl auch die Monozyten als die BPA-Produzenten beschrieben wurden (81).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse und Überlegungen erschien uns die Untersuchung konditionierter Medien sinnvoll.

Andererseits untersuchten wir den Effekt einer 1-stündigen Präinkubation der Stammzellquelle, der PBMC, in einer Flüssigkeitskultur. Diese enthielt jeweils DB-cAMP oder 8-Br-cGMP oder Kontrollsubstanz. Nach dieser Präin-

kubation und mehrfachem "Waschen" der PBMC erfolgte dann die Aussiedlung der Stammzellen in einem zyklischen Nukleotid-freien Kulturmedium. Dieser Versuchsansatz bezog seine theoretische Berechtigung aus zwei Tatsachen: 1. Die zyklischen Nukleotide haben eine sehr kurze Halbwertzeit (10). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, daß schon nach ca. 24 h keine wirksamen Konzentrationen an zyklischen Nukleotiden mehr im in vitro-System vorhanden sind.

2. Die molekularen Abläufe, die durch die zyklischen Nukleotide beeinflußbar sind oder durch sie gesteuert werden, sind nur in einer sehr kurzen Spanne des Zellzyklus durch die zyklischen Nukleotide manipulierbar. (4, 7, 18).

3.2.1. Wirkung von DB-cAMP, 8-Br-cGMP, Adenosin und Butyrat nach Zufügung zum in vitro-System zum Zeitpunkt t_o der Inkubation

Wie oben geschildert, wurden die Tage 8 und 11 der Inkubation zur Quantifizierung eines möglichen Effekts der getesteten Substanzen ausgewählt. Folgende Konzentrationen von DB-cAMP, 8-Br-cGMP, Adenosin sowie Butyrat wurden jeweils getestet: 1×10^{-3}M, 1×10^{-4}M und 1×10^{-5}M.
Als Kontrolle dienten jeweils Ansätze ohne Testsubstanz.
Die Abbildung 6 zeigt die Anzahlen der BFU-E Kolonien am Tag 8 der Inkubation.
Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, wurde die Proliferation der BFU-E durch DB-cAMP konzentrationsabhängig gehemmt.
Bei der höchsten getesteten Konzentration von 1 c 10^{-3}M war diese inhibitorische Wirkung am stärksten ausgeprägt, sie war noch deutlich bei der mittleren Konzentration von 1×10^{-4}M vorhanden. Bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 1×10^{-5}M ergab sich kein wesentlicher Unterschied zur Wirkung der anderen drei getesteten Substanzen bei allen drei getesteten Konzentrationen. Weder 8-Br-cGMP noch Adenosin oder Na-Butyrat zeigten eine meßbare Wirkung auf die BFU-E Proliferation.
In der Abbildung 7 sind die Anzahlen der BFU-E Kolonien in Abhängigkeit der 4 Testsubstanzen in den drei getesteten Konzentrationen als Prozent

der Kontrolle angegeben.
Diese Aufstellung in relativen Werten im Vergleich zur Kontrolle wurde aus folgender Überlegung heraus vorgenommen: Die interindividuellen Schwankungen des Gehalts des peripheren Blutes an BFU-E sind erheblich (12). So wurden für den Probanden 1 in der Kontrolle 45 BFU-E Kolonien gefunden, für den Probanden 6 ergaben sich hingegen nur 12 BFU-E Kolonien. Insgesamt stellten also die gesamten BFU-E Kolonien des Probanden 6 nur etwa 35% der BFU-E Kolonien des Probanden 1 dar.
Intraindividuell hingegen ergab sich eine derartige Varianz nicht. So wurden bei dem Probanden 2 am Tag 8 der Inkubation in der Kontrolle 27 BFU-E Kolonien und 29 BFU-E Kolonien gefunden.
Derartig geringe intraindividuelle Schwankungen fanden sich in allen Experimenten bei allen Probanden.

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die absoluten und die relativen Anzahlen der BFU-E Kolonien für den Tag 11 der Inkubation. Die am Tag 8 gefundenen Verhältnisse bestätigten sich und verdeutlichten sich wegen der besseren Quantifizierbarkeit. Diese bessere Quantifizierbarkeit war durch die höheren absoluten BFU-E Anzahlen gegeben.
DB-cAMP hemmte konzentrationsabhängig die BFU-E Proliferation, 8-Br-cGMP, Adenosin sowie Butyrat zeigten keine Wirkung.

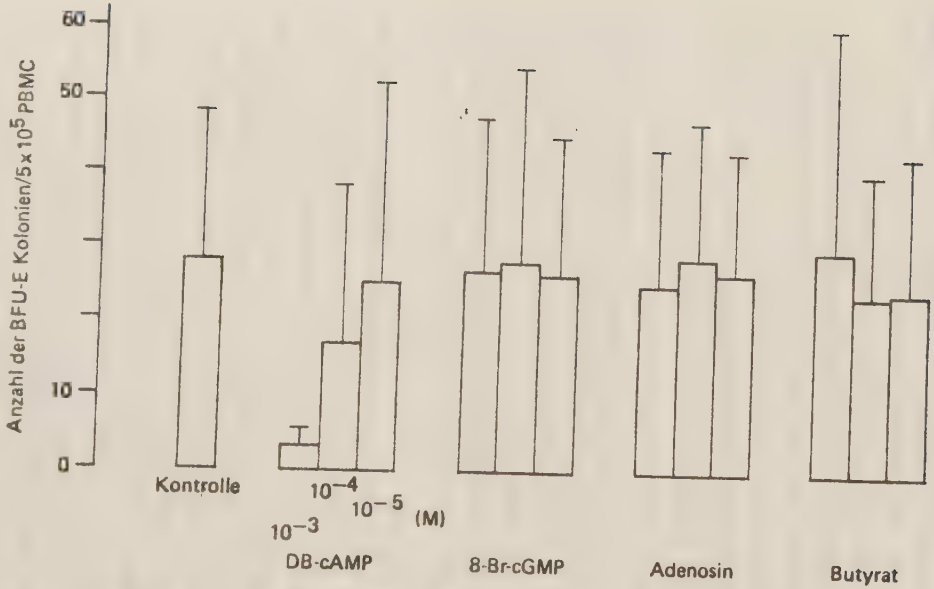


Abbildung 6: Absolute Anzahl der BFU-E Kolonien; Tag 8 der Inkubation; Einfluß verschiedener Konzentrationen an DB-cAMP und an 8-Br-cGMP (n=6) und an Butyrat und Adenosin (n=3); Mittelwerte $\pm$ einfache Standardabweichung

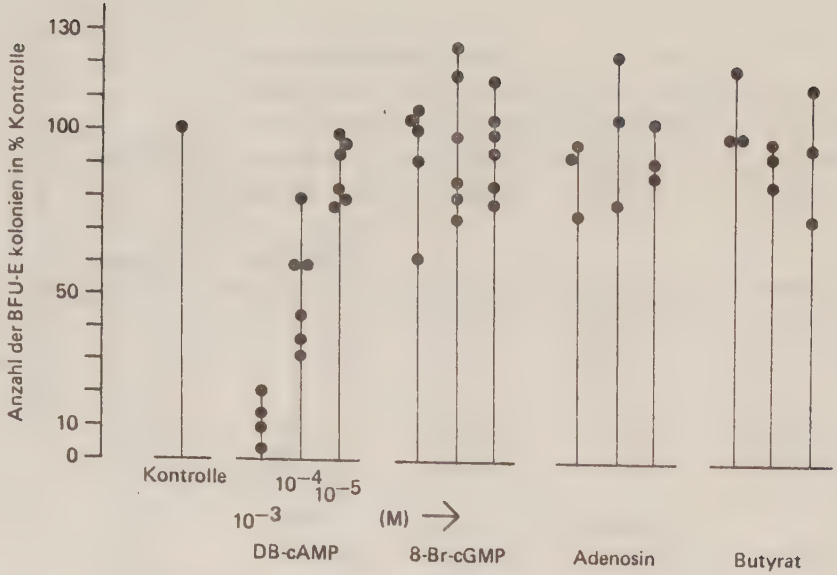


Abbildung 7: Relative Anzahl an BFU-E Kolonien im Vergleich zur Kontrolle (=100%); Tag 8 der Inkubation; Einfluß verschiedener Konzentrationen an DB-cAMP und 8-Br-cGMP (n=6) und an Adenosin und Butyrat (n=3)

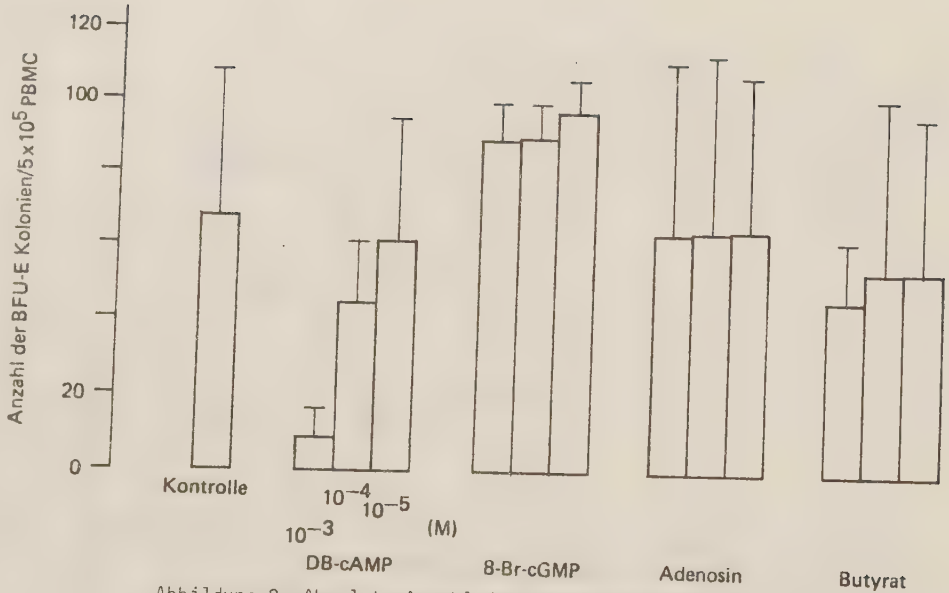


Abbildung 8: Absolute Anzahl der BFU-E Kolonien; Tag 11 der Inkubation; Einfluß verschiedener Konzentrationen an DB-cAMP und 8-Br-cGMP (n=5) und an Adenosin und Butyrat (n=3); Mittelwerte $\pm$ einfache Standardabweichung

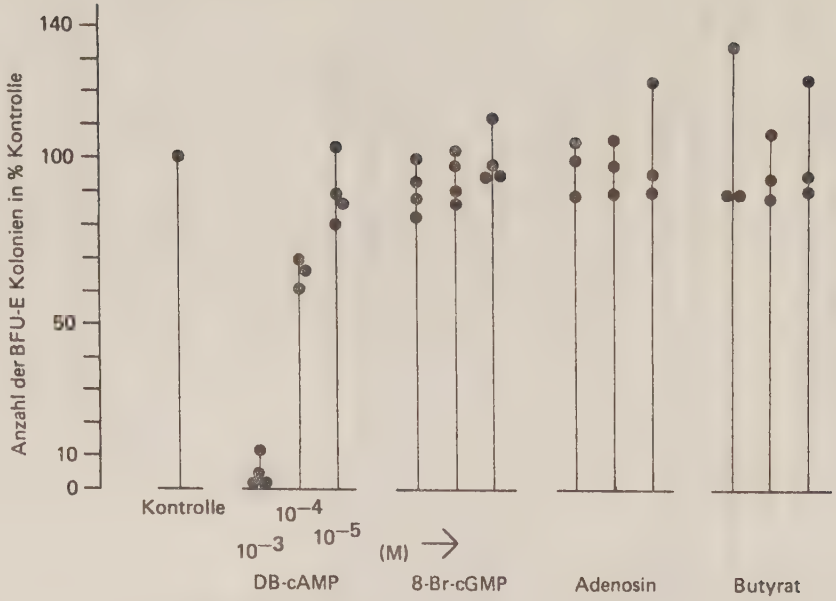


Abbildung 9: Relative Anzahl an BFU-E Kolonien im Vergleich zur Kontrolle (= 100%); Tag 11 der Inkubation; Einfluß verschiedener Konzentrationen an DB-cAMP und 8-Br-cGMP (n=5) und an Adenosin und Butyrat (n=3)

3.2.2. Wirkung von DB-cAMP-, 8-Br-cGMP-, Adenosin- und Butyrat-konditionierten Medien

Durch Zugabe von konditionierten Medien aus z.B. PHA-M-stimulierten PBMC kann in dem in vitro-System eine Proliferationssteigerung der BFU-E erreicht werden (46). Die in dem konditionierten Medium wirksame Substanz ist, wie oben dargestellt, die BPA (14).

Da andererseits das Sekretionsverhalten der Lymphozyten als Teil der PBMC durch zyklische Nukleotide modifizierbar ist (29), untersuchten wir die Frage, ob entsprechend konditionierte Medien eine Wirkung auf die Proliferation der BFU-E ausüben.

Neben der Konditionierung durch die zyklischen Nukleotide sowie Adenosin und Butyrat erfolgte auch die Konditionierung durch PHA-M (46,58).

Aus der Abbildung 10 ist zu entnehmen, daß keines der getesteten konditionierten Medien einen Effekt auf die BFU-E Proliferation zeigte. Keine der 5 Testsubstanzen,DB-cAMP, 8-Br-cGMP, Adenosin, Butyrat sowie PHA-M führten zu einer signifikanten Änderung der BFU-E Kolonieanzahlen.

Daß auch PHA-M-konditioniertes Medium nur zu einer unwesentlichen Steigerung der BFU-E Proliferation führte, ist wahrscheinlich auf die endogene Spontanproduktion an BPA in dem in vitro-System selbst zurückzuführen (12).

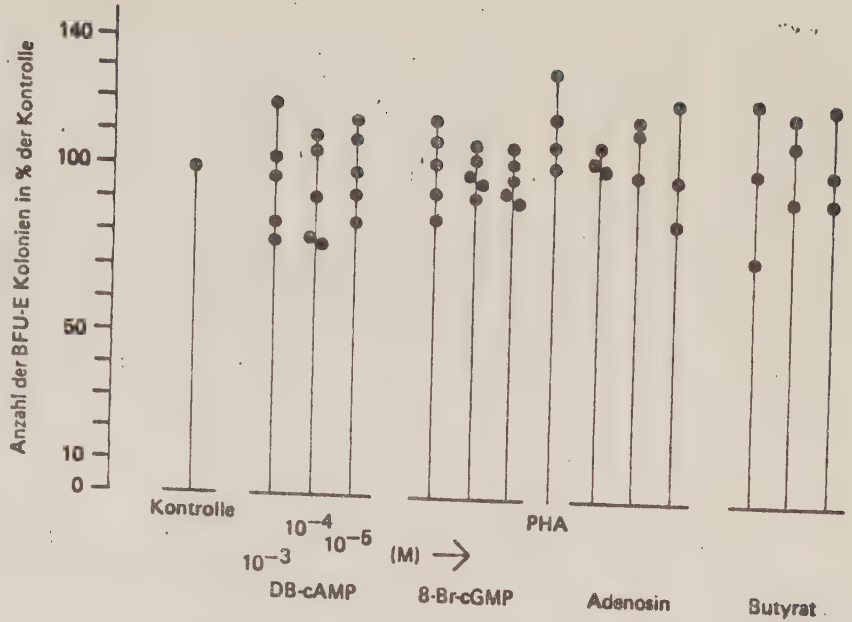


Abbildung 10: Einfluß verschiedener konditionierter Medien auf die Anzahl der BFU-E Kolonien; Tag 11 der Inkubation; Konditionierung durch verschiedene Konzentrationen an DB-cAMP und 8-Br-cGMP (n=5) sowie Adenosin und Butyrat (n=3) und PHA-M (1% v/v) (n=4)

3.2.3. Wirkung einer 1-stündigen Präinkubation der PBMC in Testsubstanz-Flüssigkeitskulturen

Die dritte Versuchsanordnung bestand in einer 1-stündigen Präinkubation der Stammzellquelle (PBMC) in Flüssigkeitskulturen. Diese enthielten in den Konzentrationen: 1 x 10^{-3}M, 1 x 10^{-4}M oder 1 x 10^{-5}M entweder DB-cAMP, 8-Br-cGMP, Adenosin oder Butyrat, oder es wurde keine Testsubstanz hinzugefügt (= Kontrolle).

Wie unter " Material und Methoden " beschrieben, erfolgte nach der Präinkubation das mehrfache "Waschen" der PBMC, wodurch die möglichst komplette Entfernung der Testsubstanzen aus der PBMC-Suspension angestrebt wurde. Das ursprüngliche Volumen der PBMC-Suspension wurde durch diese Waschvorgänge auf etwa 1/60 des Ausgangswertes reduziert.

Die Abbildung 11 zeigt, daß auch die einstündige Präinkubation in DB-cAMP-haltigem Medium die Proliferation der BFU-E konzentrationsabhängig hemmte. Die benutzten anderen Testsubstanzen, 8-Br-cGMP, Adenosin, Butyrat, waren auch bei der Präinkubation ohne Wirkung auf die BFU-E Proliferation.

Die hemmende Wirkung des DB-cAMP war wiederum bei der höchsten Konzentration (1 x 10^{-3}M) am stärksten ausgeprägt. Es fanden sich im Mittel nur etwa 10 % der BFU-E Kolonien der Kontrolle. Bei der nächstniedrigeren Konzentration von 1 x 10^{-4}M fanden sich etwa 55 % der Kontrolle. Bei einer Konzentration von 1 x 10^{-5}M ergab sich kein Unterschied zur Kontrolle, es fanden sich etwa 95 % der BFU-E Kolonien der Kontrolle.

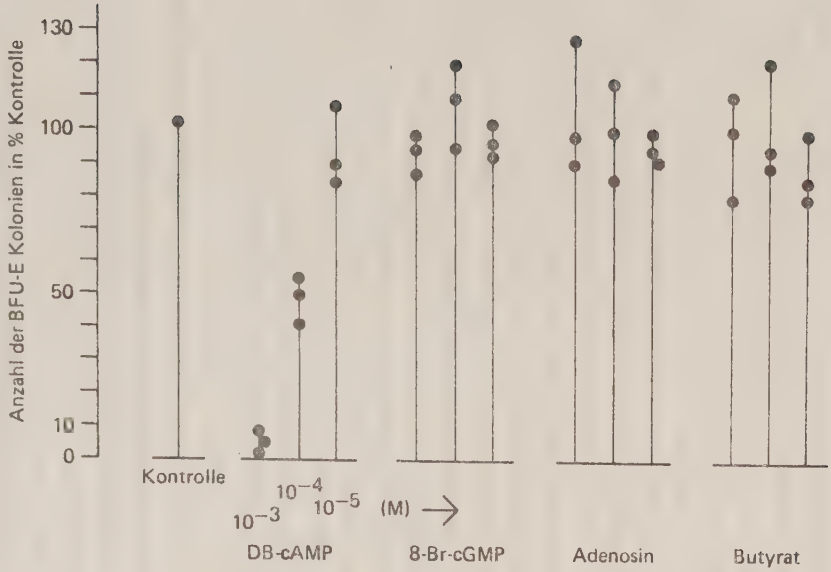


Abbildung 11: Relative Anzahl der BFU-E Kolonien im Vergleich zur Kontrolle (= 100%); Einfluß einer 1-stündigen Präinkubation der PBMC in Flüssigkeitskulturen mit verschiedenen Konzentrationen an DB-cAMP, 8-Br-cGMP, Adenosin und Butyrat; Tag 11 der Inkubation; n=3

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluß zweier zyklischer Nukleotide, des DB-cAMP und des 8-Br-cGMP auf die Proliferation primitiver erythroider Stammzellen des peripheren Blutes in vitro.
Diesen beiden zyklischen Nukleotiden war lange Zeit ein allgemeines Antagonistenverhältnis zugeschrieben worden (4, 7, 18, 21, 44). Dieses Konzept kann heute nicht mehr aufrecht erhalten werden (2, 63), auch wenn im speziellen Fall ein Wirkungsantagonismus beschrieben wird. Dies ist im Bereich der Hämopoese für einige Zellreihen der Fall (28).
Das Interesse an der Frage, ob die zyklischen Nukleotide einen Effekt auf die Proliferation der BFU-E des peripheren menschlichen Blutes (82) ausüben, ergab sich aus der Tatsache, daß die zyklischen Nukleotide als wirksame Regulationssubstanzen der Differenzierung und der Proliferation hämopoetischer Zellen bekannt sind (5,9,10,11,22,26,29,40,48,60,64,68,74).
Die Wirkung zyklischer Nukleotide auf die Proliferation der BFU-E des peripheren Blutes war bislang noch nicht untersucht worden. Diese BFU-E sind Teil der als PBMC bezeichneten Zellpopulation des peripheren Blutes. Sie sind somit ohne größeren Aufwand nahezu routinemäßig von Normalpersonen und auch von hämatologischen Patienten zu gewinnen.
Daher haben wir uns auf die Untersuchung dieser Zellpopulation konzentriert.
Als Meßgröße der Wirkung der zyklischen Nukleotide auf die Proliferation der BFU-E diente die Anzahl der erythroiden Kolonien (12, 15, 42, 82).
Die Quantifizierung dieser Kolonien erfolgte nach 8 und nach 11 Tagen Inkubation.

Grundsätzlich erscheint eine Beeinflussung der Proliferationseigenschaften der BFU-E auf zumindest zwei verschiedenen Wegen möglich:

1. Die zyklischen Nukleotide greifen direkt an der Stammzelle, der CFU-S oder der BFU-E an

Oder

2. Die zyklischen Nukleotide greifen an einer Zellpopulation an, die die Proliferation der BFU-E oder der CFU-S auf humoralem oder zellulärem Weg moduliert. Die humorale Modulation der BFU-E Proliferation erfolgt über das als BPA bezeichnete Interleukin (Lymphokin). Die beiden

Zellpopulationen, denen bislang kontrovers die Bildung und die Sekretion der BPA zugeschrieben wird, sind die Monozyten und die T-Lymphozyten (13, 30, 41, 42, 50, 56, 77, 78, 79, 81).
Andererseits werden auch Zell-Zell Interaktionen, die zur Proliferationssteuerung der BFU-E dienen, diskutiert (81).

In den bislang zum Thema "Zyklische Nukleotide und Hämopoese in vitro" erschienenen Arbeiten, in denen die BFU-E untersucht wurden, fanden lediglich die BFU-E des menschlichen Knochenmarks Beachtung (11, 60, 64).
Die BFU-E des peripheren Blutes des Menschen wurden bislang nicht unter diesem Aspekt untersucht.
Die genannten Arbeiten untersuchten den möglichen Einfluß zyklischer Nukleotide auf die hämopoetischen Stammzellen einzig in der Form, daß zu dem in vitro-System zum Zeitpunkt t_0 der Inkubation die jeweiligen zyklischen Nukleotide hinzugefügt wurden. Die Quantifizierung eines möglichen Effekts wurde dann nach unterschiedlichen langen Inkubationszeiten durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte in jedem Falle durch das Zählen der im in vitro-System entstandenen Kolonien.
Die Wirkung verschieden langer Expositionszeiten der Stammzellen und der möglichen Produzenten humoraler Regulationssubstanzen gegenüber den zyklischen Nukleotiden wurde trotz der bekannten molekularen Wirkungsmechanismen der zyklischen Nukleotide (4, 17, 18, 21) bislang nicht untersucht.
Ebenfalls nicht untersucht wurde bislang die mögliche Wirkung von durch zyklische Nukleotide konditionierten Medien. Das experimentelle Instrument der konditionierten Medien wird im Bereich der experimentellen Hämatologie häufig angewandt und es sind zahlreiche Arbeiten über die proliferationsverändernden Eigenschaften solcher Medien publiziert (45,47,51,62,72,80).

Die vorliegende Arbeit stellt nun den Versuch dar, durch verschiedene experimentelle Ansätze den Angriffspunkt einer möglichen Wirkung zyklischer Nukleotide auf die Proliferation der BFU-E einzuengen.
Der erste experimentelle Ansatz bestand in der Zufügung zyklischer Nukleotide und entsprechender Kontrollsubstanzen zum in vitro-System zum Zeitpunkt t_0 der Inkubation. Dabei zeigte sich, daß DB-cAMP ein konzentrationsabhängiger Hemmstoff der BFU-E Proliferation ist. 8-Br-cGMP sowie die Kon-

trollsubstanzen Adenosin und Butyrat zeigten keinen Effekt. Die Auswahl von Adenosin und Butyrat als Kontrollsubstanzen erfolgte, da im in vitro-System aus DB-cAMP sowohl Adenosin als auch Butyrat freigesetzt wird. Es hätte sich daher bei der gefundenen inhibitorischen Wirkung des DB-cAMP auch um einen Adenosin- oder Butyrat-Effekt handeln können.
Waren in Arbeiten zum Thema "Zyklische Nukleotide und Hämopoese" bei Verwendung des DB-cAMP auch Kontrollen mit Adenosin und Butyrat durchgeführt worden, was nur in zwei Fällen geschah, so zeigten sie keine Wirkung bei vorhandener Wirkung des DB-cAMP (10, 48). Die Proliferation der CFU-M/G ließ sich auch durch eine ähnlich wie bei uns hohe Konzentration, nämlich $0{,}75 \times 10^{-3}$M (Adenosin), nicht hemmen (48). Dies macht auch einen unspezifischen, u.U. toxischen Effekt unwahrscheinlich.
Nachdem die inhibitorische Wirkung des DB-cAMP auf die Proliferation dokumentiert war, schloß sich der nächste Versuchsansatz an: die Testung von zyklischen Nukleotid-konditionierten Medien. Dieser experimentelle Ansatz ging von der Überlegung aus, daß die Proliferation der BFU-E unter der Kontrolle humoraler Regulationnsubstanzen, als BPA bezeivhnet (14),steht. Diese BPA findet sich in konditionierten Medien z.B. aus PBMC, wenn diese mit Phytohämagglutinin-M, Concavalin A oder Pokeweed Mitogen stimuliert wurden (45, 51, 58, 62, 72). Unsere Überlegung war, daß die inhibitorische Wirkung des DB-cAMP durch eine Konditionierung der PBMC durch DB-cAMP staatfände. Diese hätte dann als sekundäre Wirkung eine Hemmung der BFU-E Proliferation zur Folge. Die Grundlage zu dieser Überlegung findet sich in der Tatsache, daß die zyklischen Nukleotide das Produktions- und das Sekretionsverhalten von Lymphozyten beeinflussen (29). Andererseits enthält die zur Gewinnung der konditionierten Medien benutzte Zellpopulation, die PBMC, etwa 70% Lymphozyten. Diesen Lymphozyten wird die BPA-Produktion zugeschrieben, wenn auch andere Arbeiten den Monozyten die Produktion der BPA zuweisen. Zahlreiche Literatur zu dieser Kontroverse ist erschienen (14, 30, 42, 56, 77, 78, 81).
Unsere konditionierten Medien zeigten jedoch keinen Einfluß auf die BFU-E Proliferation, insbesondere auch nicht das DB-cAMP-konditionierte Medium. Somit erscheint es unwahrscheinlich, daß die hemmende Wirkung des DB-cAMP auf die Sekretion eines humoralen Inhibitors der BFU-E Proliferation, aus-

gelöst durch DB-cAMP, zurüchzuführen sei. Im Bereich der Hämopoese ist beispielsweise für die menschliche Megakaryozyten Stammzelle (CFU-Meg) ein solcher humoraler Inhibitor beschrieben (72).
Interessanterweise jedoch erbrachte die einstündige Präinkubation der PBMC in DB-cAMP-haltiger Flüssigkeitskultur vor dem Aussiedeln der PBMC im "plasma clot" eine hemmende Wirkung auf die Proliferation der BFU-E, die der für den ersten Versuchsansatz (Zufügen von DB-cAMP zum "plasma clot" zum Zeitpunkt t_o) gefundenen Hemmwirkung nahezu identisch war. Die Kontrollsubstanzen sowie 8-Br-cGMP waren auch hier ohne meßbare Wirkung.

Aus den eben erinnerten Befunden läßt sich die Hypothese ableiten, daß die Hemmwirkung des DB-cAMP durch oder zumindest im Zusammenhang mit zwei Tatsachen zu interpretieren ist:

1. Die Halbwertzeit des DB-cAMP im in vitro-System ist sehr kurz (10), sodaß auch nur von einer sehr kurzen Zeitspanne der möglichen Beeinflussung der Zellen im in vitro-System ausgegangen werden darf. Hypothetisch erscheint es daher unerheblich, ob die DB-cAMP-empfindlichen Zellen längere Zeit oder nur eine sehr kurze Zeit (Präinkubationsexperimente) dem DB-cAMP exponiert blieben.
2. Der Einfluß der zyklischen Nukleotide auf den Zellzyklus ist auf eine sehr kurze Zeitspanne beschränkt (4, 7). Auch aus diesem Grund erscheint es plausibel, daß die sehr kurzzeitige Präinkubation der Stammzellen in DB-cAMP-haltiger Flüssigkeitskultur eine Hemmung der BFU-E Proliferation erbrachte, die nur unwesentlich schwächer ausgeprägt war als die Hemmwirkung des DB-cAMP, wenn es zum Zeitpunkt t_o dem in vitro-System zugefügt worden war und danach darin verblieb.

Die kurzzeitige Inkubation der dann weiterhin im "plasma clot" ausgesiedel-

ten PBMC kann zwei verschiedene Effekte bewirkt haben, von denen jeder einzeln zu einer verminderten BFU-E Proliferation geführt haben könnte:
Erstens könnte DB-cAMP direkt an der Stammzelle, der BFU-E oder der CFU-S, angegriffen haben. Von zahlreichen Zellreihen ist ihre direkte Beeinflußbarkeit durch DB-cAMP beschrieben (32, 48, 68). Dabei konnte jeweils eine Hemmwirkung des DB-cAMP auf die Proliferation festgestellt werden. Im Bereich der Hämopoese wurde die determinierte Stammzelle der Granulozyto-Monozytopoese, die CFU-M/G, besonders gründlich in diesem Zusammenhang untersucht (60, 64). In den Arbeiten, die eine Hemmwirkung des DB-cAMP auf die CFU-M/G nachweisen konnten, wurde, wie von uns auch für die BFU-E, die Zahl der im in vitro-System entstandenen Kolonien als Parameter der Hemmwirkung benutzt. Es erfolgte die Quantifizierung der CFU-M/G Kolonien. Dabei wurde allerdings jeweils dem in vitro-System auch CSF exogen beigefügt. Diesem CSF entspricht im Bereich der Erythropoese die BPA. Da dadurch die humorale Modulation der CFU-M/G Proliferation durch das DB-cAMP über den Mechanismus einer möglichen Beeinflussung der Produktion und/oder Sekretion des CSF unwahrscheinlich, wenn nicht unmöglich erschien, wurde die Hemmwirkung des DB-cAMP als direkte Wirkung an der Stammzelle interpretiert.
Zweitens könnte das DB-cAMP seine Hemmwirkung auf die BFU-E Proliferation durch eine Hemmung der Zellen hervorgerufen haben, die in dem in vitro-System die BPA produzieren.
Unter Verwendung des von uns benutzten Systems kann zwischen den beiden erwähnten Möglichkeiten des Mechanismus der Hemmwirkung des DB-cAMP auf die Proliferation der BFU-E nicht unterschieden werden.
Es bleibt die Frage offen, ob DB-cAMP direkt an einer Stammzelle oder an einer die Stammzellproliferation modulierenden Zellpopulation angreift.

Zur weiteren Klärung dieser Frage bietet sich unserer Meinung nach die Auftrennung der PBMC mittels monoklonaler Antikörper an. Nach Komplement-vermittelter Zytolyse unter Verwendung dieser jeweils unterschiedlichen, für Monozyten und für Lymphozyten hochspezifischen Antikörpern, wird die Herstellung von Monozyten- bzw. T-Lymphozyten-freien Zellpopulationen kein Problem darstellen. Dann wird entschieden werden können, ob, und wenn ja, welche der beiden zur Diskussion stehenden Zellpopulationen eine regulatorische Wirkung auf die BFU-E Proliferation ausübt. Andererseits wird dann

auch die Frage geklärt werden, an welcher Zellpopulation die Hemmwirkung des DB-cAMP auf die Proliferation der BFU-E angreift.

5. Zusammenfassung der Arbeit

Die zyklischen Nukleotide, als deren Vertreter hier DB-cAMP und 8-Br-cGMP sowie entsprechende Kontrollsubstanzen untersucht wurden, sind ubiquitäre biologisch aktive Substanzen, die auf die Proliferation und auf die Differenzierung zahlreicher Zellsysteme Einfluß ausüben. Ihre Wirksamkeit bezüglich hämopoetischer Stammzellen, der CFU-Meg, der CFU-M/G sowie der CFU-E, ist in der Literatur dokumentiert. Bislang nicht untersucht war die primitive erythroide Stammzelle (BFU-E) des peripheren menschlichen Blutes. Mittels der "plasma clot"-Technik wurde die Proliferation der BFU-E durch Quantifizierung der im in vitro-System entstandenen BFU-E Kolonien untersucht.
Der Einfluß zyklischer Nukleotide wurde in drei verschiedenen Versuchsanordnungen untersucht: 1. Inkubation mit zyklischen Nukleotiden im in vitro-System vom Zeitpunkt t_0 an. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Hemmwirkung des DB-cAMP festgestellt werden. 8-Br-cGMP, Adenosin und Butyrat waren ohne Effekt. 2. Testung konditionierter Medien: Dabei zeigte sich in keinem Fall eine Wirkung der konditionierten Medien, insbesondere auch das DB-cAMP-konditionierte Medium war ohne Effekt. 3. 1-stündige Präinkubation in Flüssigkeitskulturen unter Zufügung der Testsubstanzen: Hierbei konnte wiederum eine konzentrationsabhängige Hemmwirkung des DB-cAMP in einem Bereich von 1×10^{-3}M bis zu 1×10^{-5}M gefunden werden. Alle anderen Testsubstanzen ergaben keine Wirkung.
Der Wirkungsansatz des DB-cAMP ist kontrovers. Es kann sich um einen Ansatz direkt an einer Stammzelle handeln, wofür unter Umständen die Analogie zu den für die Stammzelle der Granulozyto-Monozytopoese, die CFU-M/G, gefundenen Verhältnissen spricht.
Andererseits ist ein Angriffspunkt des DB-cAMP an einer die humorale Regulationssubstanz der BFU-E, der BPA, -bildenden Zellpopulation möglich. Weitere Untersuchungen mit fraktionierten Zellpopulationen sollten diese Frage klären.

6. Literaturverzeichnis

1. Adamson, J.W.
Diskussionsbeitrag
Blood Cells, 4,228,1978

2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.
Molecular Biology of the Cell, Seite 736-742
Garland Publishin; New York, 1983

3. Barr, R.D., Whangpeng, J., Perry, S.
Hemopoietic stem cells in human peripheral blood
Science, 190,284-285,1976

4. Baserga, R.
Multiplication and division in mammalian cells
M. Decker; New York, 1976

5. Bombik, B.M., Serke, St.
Human megacaryopoiesis: influences of cyclic nucleotides
Exp.Hemat.,9, Suppl.9,136,1981

6. Bombik, B.M., Serke, St.
Human megacaryopoiesis in vitro: bone marrow studies in healthy and leucemic men; Seite 577-578 in:
Advances in comparative leucemia research; Eds. Yohn, D.S., Blakeslee, J.R.; Elsevier North-Holland, 1982

7. Boynton, A.L., Whitfield, J.F.
The role of cAMP in cell proliferation: a critical assessment of the evidence
Adv.Cycl.Nucl.Res.,15,193-292,1983

8. Boyun, A.
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood
Scand.J.Clin.Invest.,21,Suppl.97,77-109,1968

9. Brown, J.E., Adamson, J.W.
Cyclic nucleotides´influence on in vitro hemesynthesis
Exp.Hemat.,8,Suppl.1,913,1980

10. Brown, J.E., Adamson, J.W.
Studies of the influence of cyclic nucleotides on in vitro hemoglobinsynthesis
Br.J.Hemat.,35,193-208,1977

11. Brown, J.E., Adamson, J.W.
Modulation of in vitro erythropoiesis: enhancement of erythroid colony growth by cyclic nucleotides
Cell Tissue Kin.,10,289-298,1977

12. Clarke, B.J., Housman, D.
Charakterization of an erythroid precursor cell of high proliferative capacity in normal human peripheral blood
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,74,1105-1109,1977

13. Chess, L., Schlossman, S.F.
Human lymphocyte subpopulations
Adv.Immun.,25,213-252,1977

14. Dunn, W.
Current concepts in erythropoiesis
Wiley and Sons, New York, 1983

15. Eaves, C.J., Eaves, A.C.
Erythropoietin dose-response curves for 3 classes of erythroid progenitors in normal human marrow and in patients with polycythemia vera
Blood,52,1196-1210,1978

16. Erythropoiesis in culture; Seite 380-395 in:
Clin.Hemat.,13,2;1984

17. Friedman, D.L.
Role of cyclic nucleotides in cell-growth and -differentiation
Phys.Rev.,56,4;652-708,1976

18. Friedman, D.L., Johnson, R.A., Zeilig, C.E.
The role of cyclic nucleotides in the cell-cycle
Adv.Cycl.Nucl.Res.,7,69-111,1976

19. Gauwerky, C.E., Golde, D.W.
Hämopoetische Stammzellen und ihre Wachstumsfaktoren
Klin.Wschr.,61,975-981,1983

20. Goldberg, N.D., Haddox, M.K., Nicol, S.E., Glass, D.B., Sanford, C.H., Kuehl, F.A., Estensen, R.
Biological regulation through opposing influences of cyclic AMP and cyclic GMP: the Yin-Yang Hypothesis
Adv.Cycl.Nucl.Res.,5,307-330,1975

21. Goldberg, N.D.
Editorial Comments: cyclic nucleotides and cellular events related to cell-growth
Adv.Cycl.Nucl.Res.,12,147-150,1980

22. Golde, D.W., Cline, M.J.
Hormonal interactions with hemopoietic cells in vitro
Transpl.Proc.,10,1;95-97,1978

23. Goldwasser, E.
Some thoughts on the nature of the erythropoietin-responsive cells
J.Cell.Phys.,21,Suppl.1,133-135,1982

24. Goldwasser, E.
Erythropoietin and the differentiation of red blood cells
Fed.Proc.,34,2285-2292,1975

25. Gordon, D.M., Bray, M.A., Morley, J.
Control of lymphokine sekretion by prostaglandins
Nature,262,401-402,1976

26. Gorshein, D., Reisner, E.M., Gardner, F.M.
Effects of steroids and cAMP on hemesynthesis
Am.J.Phys.,228,1024-1028,1975

27. Gregory, C.J., Eaves, A.C.
Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses
Blood,49,6,855-864,1977

28. Hadden, I.W., Hadden, E.M., Haddox, M.K., Goldberg, N.D.
Cyclic GMP: a possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,69,352-364,1972

29. Hadden, I.W.
Cyclic nucleotides in lymphocyte function
Ann.N.Y.Acad.Sci.,256,352-364,1975

30. Haq, A.U., Rinehart, J.J., Balcerzak, S.P.
T-cell subsets - modulation of peripheral blood burst forming unit-erythroid
J.Lab.Clin.Med.,101,53-57,1983

31. Henney, C.S., Gaffney, J., Bloom, B.R.
On the relation of products of activated lymphocytes to cell-mediated cytolysis
J.Exp.Med.,140,837-852,1974

32. Heydrick, M.L., Ryan, W.L.
Cyclic nucleotides on cell-growth in vitro
Cancer Res.,30,376-378,1970

33. Humphries, R.K., Jacky, P.B., Dill, F.J.
CFU-S in individual erythroid colonies derived in vitro from adult mouse bone marrow
Nature,279,718-720,1979

34. Iscove, N.N., Guilbert, L.J.
Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in hemopoietic cell-cultures
Nature,263,594-595,1976

35. Jakobs, K.M., Aktories, K., Schulz, G.
Mechanisms and components involved in adenylate-cyclase inhibition by hormones
Adv.Cycl.Nucl.Prot.Phos.Res.,17,135-143,1984

36. Johnson, G.R.
Hematopoietic multipotential stem cells in culture
Clin.Hemat.,13,2,309-328,1984

37. Keller, G.M., Philips, R.A.
Detection in vitro of a unique, multipotential hemopoietic progenitor
J.Cell.Phys.,21,Suppl.1,31-36,1982

38. Kondrashin, A.A.
cAMP and regulation of gene expression
T.I.B.S.,3,97-98,1985

39. Krystal, G.
Physical and biological characterization of erythroblast enhancing factor (EEF), a late acting erythropoietic stimulator in serum distinct from erythropoietin
Exp.Hemat.,11,1,18-31,1983

40. Kurland, J.I., Hadden, J.W., Moore, M.A.S.
Role of cyclic nucleotides in the humoral regulation of hemopoietic progenitor cell proliferation
Cancer Res.,37,4534-4538,1977

41. Lipton, J.M., Reinherz, E.L., Kudisch, M., Jackson, P.L., Schlossman, S.F., Nathan, D.G.
Mature bone marrow BFU-E do not require T-cells for induction of erythropoietin-dependent differentiation
J.Exp.Med.,152,350-360,1980

42. Mangan, K.F., Chikkapa, G., Bieler, L.Z., Scharfman, W.B., Parkinson, D.R.
Regulation of human blood BFU-E proliferation: T-lymphocyte subpopulations defined by FC-receptors and monoclonal antibodies
Blood,59,5,990-996,1982

43. McLeod, D.L., Shreeve, M.M., Axelraad, A.A.
Improved plasma culture method for production of erythrocytic colonies in vitro: a quantitative assay method for CFU-E
Blood,44,4,517-534,1974

44. Mednieks, M.I., Dewys, W.D., Jungmann, R.A.
cAMP dependent proteinkinase in L 1210 cells
Adv.Cycl.Nucl.Prot.Phos.Res.,12,420-421,1980

45. Metcalf, D.
Hemopoietic Colonies (Kapitel 2,3,4,10,14)
R.R.C.R.,61,1977

46. Meytes, D., Ortega, J.A., Shore, N.A., Dukes, P.P.
Human erythroid burst promoting activity produced by PHA-M stimulated radioresistant peripheral blood mononuclear cells
Blood,54,5,1050-1057,1979

47. Moore, N.A.S., Williams, N., Metcalf, D.
In vitro colony formation by normal and leucemic human hemopoietic cells; interaction between colony forming and colony stimulating cells
J.Natl.C.Inst.,50,591-602,1973

48. Morley, A., Quesenberry, P., Garrity, M., Stohlman, F.
Inhibition of marrow growth by cyclic AMP
Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,138,57-59,1977

49. Mortensen, T.M.
Benzidine positive multicentric eosinophilic colonies in human blood mimicking erythroid bursts
Exp.Hemat.,10,1,64-70,1982

50. Nathan, D.G., Chess, L., Hillman, D.G., Clarke, B., Breard, J., Merler, E., Housman, D.E.
Human erythroid burst forming unit: T-cell requirement for proliferation in vitro
J.Exp.Med.,147,324-339,1978

51. Nicola, N.A., Metcalf, D., Johnson, G.R., Burgess, A.W.
Separation of functionally distinct human granulocyte-macrophage colony stimulating factors
Blood,54,4,614-634,1979

52. Ogawa, M., Grush, O.C., O´Dell, R.F., Hara, H., MacEachern, M.D.
Circulating erythropoietic precursors assessed in culture: charakterization in normal men and patients with hemoglobinopathies
Blood,50,6,1081-1092,1977

53. Parker, C.W.
Editorial Comments: modulation of lymphoid cell function and allergic responses
Adv.Cycl.Nucl.Res.,12,181-185,1980

54. Peschle, C.
Erythropoiesis
Ann.Rev.Med.,31,303-314,1980

55. Peschle, C., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Lettieri, F., Russo, G., Gianni, A.M., Ottolenghi, S., Comi, P., Giglioni, B.
Erythropoietic differentiation in humans: in vitro studies on erythroid progenitors and hemoglobin synthesis in fetal, newborn and adult life
Exp.Hemat.,8,Suppl.8,153-158,1980

56. Pistoia, V., Ghio, R., Nocera, A., Leprini, A., Perrata, A., Ferrarini, M.
Large granular lymphocytes have a burst promoting activity on human peripheral blood erythroid burst forming units
Blood,65,2,464-472,1985

57. Plaut, M., Marone, G., Thomas, L.L., Lichtenstein, L.M.
Cyclic nucleotides in immune response and allergy
Adv.Cycl.Nucl.Res.,12,161-172,1980

58. Porters, P.N., Ogawa, M., Leary, A.G.
Enhancement of the growth of human early erythroid progenitors by bone marrow conditioned media
Exp.Hemat.,8,1,83-88,1980

59. Prahal, J.F., Axelraad, A.A., Crookston, J.H.
Erythroid colony formation in plasma culture from cells of peripheral blood in myeloproliferative disorders and normals
Exp.Hemat.,8,Suppl.8,912,1980

60. Rossi, G.B., Migliaccio, A.R., Migliaccio, G., Lettieri, F., DiRosa, M., Mastroberardino, G., Peschle, C.
In vitro interactions of prostaglandins and cyclic AMP with murine and human erythroid progenitors
Blood,56,4,74-79,1980

61. Ritchey, A.K., Hoffman, R., Coupal, E., Floyd, V., Pearson, H.A., Forget, B.G.
Imbalanced globin chain synthesis in cultured erythroid progenitor cells from thalassemic bone marrow and peripheral blood
Blood,57,4,788-794,1981

62. Serke, St., Bombik, B.M.
Human PHA-LCM: an activity stimulating both human and murine megacaryopoiesis
Leuc.Rev.Int.,1,221-222,1983

63. Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, J.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A.
Principles of Biochemistry; Band 2 (Seite 376-388)
Mc Graw-Hill, Auckland,1983

64. Taetle, R., Mendelsohn, J.
Modulation of normal and abnormal myeloid progenitors´proliferation by cyclic nucleotides and pge_1
Blood Cells,6,701-718,1980

65. Tepperman, A.D., Curtis, J.E., McCulloch, E.A.
Erythropoietic colonies in cultures of human marrow
Blood,44,5,659-669,1974

66. Till, J.E.
Stem cells in differentiation and neoplasia
J.Cell.Phys.,21,Suppl.1,3-11,1982

67. Till, J.E., McCulloch, E.A.
A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow
Rad.Res.,14,213-222,1961

68. Tissman, G., Herbert, V.
Studies of effects of cAMP in regulation of human hemopoiesis in vitro
InVitro,9,2,86-89,1973

69. Tsang, R.W., Aye, M.T.
Evidence for proliferation of erythroid progenitor cells in the absence of added erythropoietin
Exp.Hemat.,7,7,383-388,1979

70. Vainchenker, W., Breton Gorius, J., Bouguet, J., Guichard, J.
Megacaryocyte-colony formation from human bone marrow precursors
Blood,54,4,940-945,1979

71. Vainchenker, W., Breton Gorius, J., Guichard, J.
Growth of human megacaryocyte colonies in culture from fetal, neonatal and adult peripheral blood cells: ultrastructural analysis
Blood Cells,5,25-42,1979

72. Vainchenker, W., Chapman, J., Deschamps, J.F., Vinci, G., Bouguet, J., Titeux, M., Breton Gorius, J.
Normal human serum contains a factor(s) capable of inhibiting in vitro megacaryopoiesis
Exp.Hemat.,10,8,650-660,1982

73. Vainchenker, W.
Eigene Korrespondenz
1982

74. Wagemaker, G.
Cellular and soluble factors influencing the differentiation of primitive erythroid progenitor cells (BFU-E) in vitro
in: In vitro Aspects of Erythropoiesis; Seite 44-52
Springer,New York,1978

75. Walter, U.
Cyclic GMP regulated enzymes and theit possible physiological functions
Adv.Cycl.Nucl.Prot.Phos.Res.,17,249-258,1984

76. Wisniewski, D., Platsoucas, C., Strife, A., Lambek, C., Clarkson, B.
Enrichement of hematopoietic progenitor cells from human peripheral blood
Exp.Hemat.,10,10,817-829,1982

77. Wisniewski, D., Strife, A., Wachter, M., Clarkson, B.
Regulation of human peripheral blood erythroid burst forming unit: growth by T-lymphocytes and T-lymphocyte subpopulations defined by monoclonal antibodies OKT_4 and OKT_8
Blood,65,2,456-463,1985

78. Zuckerman, K.S., Patel, V.R., Goodrum, D.D.
Production of human erythroid burst promoting activity by monocytes stimulated with bacterial lipopolysacharides
Exp.Hemat.,11,6,475-480,1982

79. Zuckerman, K.S.
Stimulation of human BFU-E by products of human monocytes and lymphocytes
Exp.Hemat.,8,7,924-932,1980

80. Zuckerman, K.S., Haak, M.
Mitogen-induced stimulation and suppression of erythroid burst promoting activity production by human mononuclear cells
Br.J.Hemat.,55,145-153,1983

81. Zuckerman, K.S.
Human BFU-E: growth is dependent on monocytes, but not T-lymphocytes
J.Clin.Inv.,67,702-709,1981

82. Zwaan, F.E.
Hemopoietic progenitor cells in peripheral blood
Blut,45,87-95,1982

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 17.10.1956 als Sohn der Annemarie Serke und des Dr.med. Ulrich Serke in Berlin.
Nach der Grundschule besuchte ich das Evangelische Gymnasium zum Grauen Kloster zu Berlin. Dieses verließ ich 1975 nach bestandenem Abitur.
Im März 1976 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin.
Im März 1978 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab, im März 1979 die erste ärzliche Prüfung. Nach Absolvierung der zweiten ärztlichen Prüfung im März 1981 führte ich das Praktische Jahr in Berlin durch.
Nach der dritten ärztlichen Prüfung wurde mir im April 1982 die Approbation als Arzt in Berlin erteilt.
Seit 1982 arbeite ich als wissenschaftlicher Assistent in der Abteilung Innere Medizin mit Schwerpunkt Hämatologie-Onkologie des Klinikums Charlottenburg in Berlin.

Danksagungen:

Mein Dank für die immer freundliche Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit gilt:
Herrn Privat Dozent Dr.B.M.Bombik †
Herrn Professor Dr.med. H.Gerhartz
Herrn Professor Dr.med. et rer.nat. G.Fuchs

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen